

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE FARMACIA**  
**Departamento de Microbiología**



**TESIS DOCTORAL**

**Polisacáridos de Botrytis Cinerea**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
PRESENTADA POR

**María Begoña Gómez Miranda**

**Madrid, 2015**



70  
1984  
136

x-53-152024 7

María Degoña Gómez Miranda

POLISACARIDOS DE BOTRYTIS CINEREA

Departamento de Microbiología  
Facultad de Farmacia  
Universidad Complutense de Madrid  
1984



BIBLIOTECA

**Colección Tesis Doctorales. Nº 136/84**

© Begoña Gómez Miranda .  
Edita e imprime la Editorial de la Universidad  
Complutense de Madrid. Servicio de Reprografía  
Noviciado, 3 Madrid-8  
Madrid, 1984  
Xerox 9200 XB 480  
Depósito Legal: M-12178-1984

Autor: MARIA BEGOÑA GOMEZ MIRANDA

POLISACARIDOS DE BOTRYTIS CINEREA

Director: Juan Antonio Leal Ojeda  
Doctor en Farmacia, Ph.D. por la Universidad  
de Hull.  
Investigador Científico del C.S.I.C.

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Facultad de Farmacia  
Departamento de Microbiología  
Año 1980

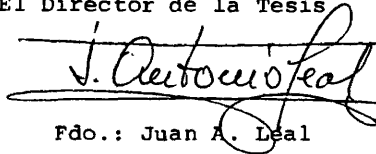


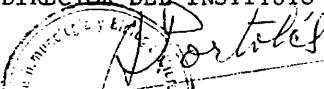
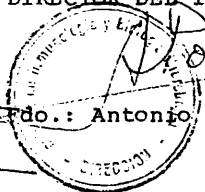
ANTONIO PORTOLES ALONSO, DIRECTOR DEL INSTITUTO DE  
INMUNOLOGIA Y BIOLOGIA MICROBIANA DEL C.S.I.C.

HACE CONSTAR y acredita que la Tesis Doctoral titulada,  
"Polisacáridos de *Botrytis cinerea*" efectuada por Dña.  
Begoña Gomez Miranda, ha sido realizada en este Institu-  
to bajo la dirección del Investigador Científico D. Juan  
A. Leal y esta Dirección está conforme con los métodos y  
técnicas empleados así como con los resultados obtenidos  
en la misma. También he de informar que todo el trabajo  
experimental y bibliográfico de dicha Tesis Doctoral ha  
sido realizado personalmente por la doctoranda.

Madrid, 9 de Noviembre de 1980  
EL DIRECTOR DEL INSTITUTO

El Director de la Tesis

  
Fdo.: Juan A. Leal

  
Fdo.: Antonio Portolés  




Quiero expresar mi agradecimiento al Dr. Juan Antonio Leal Ojeda, Investigador Científico, Jefe de la Unidad Estructural de Investigación de Ecología Microbiana del Instituto de Inmunología y Biología Microbiana del C.S.I.C., director de la presente Tesis, por la colaboración y asesoramiento prestados.

También deseo expresar mi agradecimiento:

Al Profesor Dr. C. Nombela por su amabilidad al revisar esta Tesis Doctoral y aceptar ser ponente de la misma.

A mis compañeros de laboratorio por la ayuda aportada.

A la Dra. Bellanato del Instituto de Optica Daza Valdés por su colaboración en los estudios de espectroscopía infrarroja.

Al Instituto de Inmunología y Biología Microbiana del C.S.I.C. por las facilidades dadas para realizar este trabajo.





## INDICE

INTRODUCCION .....	1
MATERIALES Y METODOS .....	19
I.- <u>Microorganismo</u> .....	19
II.- <u>Medios de cultivo</u> .....	19
1.- Medio de mantenimiento y de formación de esclerocios .....	19
2.- Germinación de esclerocios .....	20
3.- Medio base para la producción de poli- sacárido extracelular .....	22
III.- <u>Aislamiento del polisacárido extracelular</u> .....	22
IV .- <u>Aislamiento del polisacárido procedente de             esclerocios</u> .....	22
V .- <u>Análisis químico</u> .....	23
1.- Determinación de carbohidratos totales .....	23
2.- Determinación de proteína total.....	24
3.- Determinación de ion fosfato .....	25
4.- Determinación de aminoazúcares .....	26
5.- Determinación de azúcares reductores .	28
6.- Determinación de ácidos hexurónicos ..	29
7.- Determinación de lípidos .....	30
8.- Extracción de carbohidratos solubles en alcohol .....	31

VI.- <u>Análisis estructural</u> .....	32
1.- Hidrólisis química .....	32
2.- Cromatografía en papel .....	32
3.- Cromatografía de gases .....	34
4.- Oxidación de polisacárido con periodato sódico .....	35
a) Valoración del ácido fórmico con pe- riodato sódico, en la mezcla de oxi- dación .....	39
b) Determinación de formaldehído en la mezcla de oxidación con periodato sódico .....	39
5.- Reducción e hidrólisis del polisacárido con periodato sódico (degradación de Smith) .....	40
6.- Espectros infrarrojos .....	42
VII.- <u>Microscopía electrónica</u> .....	42
1.- Fijación .....	42
2.- Deshidratación para la inclusión en Araldita .....	44
3.- Inclusión .....	44
4.- Tinción .....	45
Aparatos utilizados y productos .....	46 bis

RESULTADOS .....	47
I.- <u>Composición química y estructural del polisacárido extracelular de Botrytis cinerea</u> .....	47
1.- Polisacárido extracelular .....	47
2.- Análisis químico .....	47
3.- Análisis estructural .....	49
a) Oxidación con periodato sódico del polisacárido. Valoración del ácido fórmico en la mezcla de oxidación. Degradación de Smith. Identificación de los productos resultantes por cromatografía en papel .....	49
b) Espectroscopía infrarroja del polisacárido .....	52
II.- <u>Fisiología en la producción del polisacárido extracelular</u> .....	52
1.- Efecto de la fuente de carbono .....	52
a) Efecto de la concentración de glucosa ....	52
b) Efecto de las distintas fuentes de carbono .....	55
2.- Efecto de la fuente de nitrógeno .....	55
a) Efecto de la concentración de la fuente de nitrógeno .....	55
b) Utilización de las fuentes de nitrógeno ..	64

3.- Efecto de la tiamina .....	68
4.- Efecto de la relación superficie/volumen en cultivos estáticos .....	74
III.- <u>Composición química de los esclerocios</u> .....	76
1.- Influencia de la luz en la formación de esclerocios .....	76
2.- Influencia de la temperatura en la formación de esclerocios .....	76
3.- Efecto de la fuente de carbono .....	76
a) Efecto de la concentración de glucosa en la producción de esclerocios en un medio conteniendo extracto de judías .....	76
b) Efecto de la concentración de glucosa en la formación de esclerocios en un medio sintético .....	78
4.- Análisis químico .....	78
5.- <u>Composición química de las fracciones obtenidas de los esclerocios</u> .....	82
6.- Análisis estructural .....	84
a) Oxidación con periodato sódico del polisacárido. Valoración del ácido fórmico en la mezcla de oxidación. Degradación de Smith. Identificación de los productos resultantes por cromatografía en papel .....	84

b) Espectroscopía infrarroja de los esclerocios totales y de las distintas fracciones .....	87
7.- Polisacárido presente en las distintas fracciones obtenidas de esclerocios germinados .....	87
IV.- <u>Ultraestructura de los esclerocios de B.cine- rea en estado latente y germinados</u> .....	91
1.- Diferenciación y estructura de los esclerocios .....	91
2.- Esclerocios germinados .....	92
DISCUSION .....	97
CONCLUSIONES .....	106
BIBLIOGRAFIA .....	110



## INTRODUCCION

Las células vegetales son ricas en polisacáridos. En los vegetales superiores predomina la celulosa mientras que en los hongos el polisacárido más abundante es la quitina asociada con glucanos, mananos y galactanos. Los polisacáridos producidos por los hongos pueden encontrarse: a) en el medio de cultivo, b) en la pared celular y c) como material de reserva intracelular. Los polisacáridos constituyen una parte fundamental de los esclerocios de los hongos, donde forman parte de la pared de las hifas que los constituyen, se encuentran en el interior como sustancias de reserva (Ergle, 1948) ó en el exterior formando una matriz que envuelve las hifas (Willetts, 1972).

Los microorganismos producen polisacáridos que excretan al medio de cultivo y cuya función no se conoce bien (Dudman, 1977). En las bacterias, estos polímeros de alto peso molecular, están formados por uno o varios monómeros que originan una unidad que se repite a lo largo de la cadena. Otras moléculas como la glicerina, ácidos orgánicos de bajo peso molecular y ácido pirúvico se encuentran formando éteres, ésteres o acetales respectivamente con los grupos -OH libres de los polisacáridos. Debido a que muchas bacterias producen cápsulas, formadas por polisacáridos, que tienen gran importancia en la patogeneicidad y en reacciones inmunológicas, en muchos casos fundamentales para su tipificación, los polisacáridos bacterianos han sido más estudiados. Por otra parte, el descubrimiento del dextrano, un  $\alpha$ -glucano, muy soluble en agua en la que forma soluciones viscosas capaces de reemplazar las producidas por gomas ve-



getales, ha hecho que surja una nueva industria basada en la producción de polisacáridos por microorganismos (Jeanes, 1977). Actualmente existen en el mercado varios polisacáridos microbianos y su demanda es cada día mayor ya que sus aplicaciones van en aumento y son imprescindibles en las industrias de la alimentación, farmacéutica, cosmética, tejidos, pinturas, papel, etc. Entre estos polisacáridos se encuentran los dextranos, xantanos, alginatos, "zanflo", "curdland" y el heteropolisacárido "PS-7" (Sandford y Laskin, 1977).

Algunos hongos producen polisacáridos extracelulares que contienen enlaces glucosídicos  $\beta$ -(1  $\rightarrow$  3) y  $\beta$ -(1  $\rightarrow$  6). El "sclerotan" es uno de los primeros polisacáridos de este tipo, aislado de los esclerocios de Monilinia libertiana, un  $\beta$ -(1  $\rightarrow$  3) glucano con residuos de glucosa unidos a intervalos en las posiciones  $\beta$ -(1  $\rightarrow$  6) (Kitahara y Takenchi, 1959). Johnson y col. (1963) investigaron la estructura de un polisacárido similar producido por Sclerotium rolfsii. Polisacáridos análogos han sido aislados de Claviceps purpurea. (Perlin y Taber, 1963), Pullularia pullulans (Bouveng y col., 1962), Claviceps fusiformis (Buck y col., 1968), Schizophyllum commune (Kikumoto y col., 1970a y b), Monilinia fructigena (Santamaria y col., 1978) y de los hongos superiores Plectania occidentalis y Helotium sp (Davis y col., 1965).

Los polisacáridos extracelulares de algunos hongos tienen esterificados parte de los grupos -OH con ácidos orgánicos. El ácido luteico producido por Penicillium luteum es un  $\beta$ -glucano con parte de sus -OH esterificados por el ácido malónico (Raistrick y Rintoul, 1931). Penicillium citrinum produce un polisacárido ácido compuesto de galactosa y ácido malónico denominado malonogalactano (Fujimoto y

col., 1969). Un glucano  $\beta$ -(1  $\rightarrow$  3) esterificado por el ácido málico ha sido encontrado por Leal-Serrano y col., (1980) en los cultivos de Aureobasidium pullulans. Leal (comunicación personal) ha encontrado en el Penicillium allahabadensis un  $\beta$ -glucano esterificado por el ácido malónico y otro ácido aún no identificado.

Algunas especies de Aspergillus producen un polisacárido extracelular compuesto de galactosamina y galactosa. Distler y Roseman (1960) encontraron en Aspergillus parasiticus un polisacárido al que denominaron galactosaminoglucano que es el primer polímero compuesto de N-acetil-glucosamina descrito en hongos. Posteriormente Araki y col., (1979) estudiaron la biosíntesis y degradación de este compuesto. Gorin y Eveleigh (1970) describieron un polisacárido extracelular de A. nidulans como el 2-acetamido-2-deoxi-D-galacto-D-galactano. En 1978 Leal y Rupérez encontraron en A. nidulans un polisacárido extracelular formado por D-galactosamina (70%) y D-galactosa (15%).

La pared celular de los hongos es la estructura rígida que protege al frágil protoplasto y mantiene la forma característica de la célula. El ataque enzimático controlado del micelio de los hongos, protegido osmóticamente, degrada la pared, permitiendo la liberación de los protoplastos. Diferentes aspectos de la obtención y propiedades de los protoplastos de hongos han sido revisados por Villanueva (1966).

El estudio de la pared de los hongos se inició hace tiempo. La presencia de quitina fue demostrada por Van Wisseling (1898) y posteriormente confirmada por Wettstein

(1921) y Nabel (1939). Estos primeros trabajos solo podían detectar cualitativamente la presencia de ciertas sustancias en la célula completa ya que no se habían desarrollado las técnicas para la obtención de las paredes celulares (Aronson y Machlis, 1959; Salton, 1961; Crook y Johnston, 1962). Los procedimientos utilizados para la obtención de las paredes consisten generalmente en la ruptura mecánica de las células hasta obtener pequeños fragmentos que pueden lavarse fácilmente, eliminando el material protoplasmático. La fragmentación puede conseguirse mediante presión (Novaes-Ledieu y col., 1967) o mediante homogeneizadores o vibradores mezclando el micelio con pequeñas bolas de vidrio (Hamilton y Knight, 1962; Novaes-Ledieu y col., 1967; Zonneveld, 1971). Aisladas las paredes celulares, se avanzó rápidamente en el conocimiento de su composición al mismo tiempo que se estudiaba su estructura física mediante la microscopía electrónica. Una revisión reciente de los trabajos sobre paredes de hongos se debe a Farkas (1979).

Estos estudios revelan que tanto la composición como la estructura de las paredes son complicadas. Están formadas por una red de microfibrillas inmersas en una matriz de diferentes polisacáridos. Pueden compararse a las paredes de los edificios modernos contruidos con hormigón armado. Este modelo puede explicar las propiedades mecánicas de las paredes que pueden variar al cambiar la concentración de las microfibrillas o la proporción de los polisacáridos de la matriz (Aronson, 1965; Northcote, 1972).

Los componentes simples o monómeros que forman los polímeros de la pared pueden analizarse cualitativa y cuantitativamente por cromatografía después de hidrolizar la pared

y fraccionar los hidrolizados. Las publicaciones sobre este tema demuestran que la composición de la pared sigue a grandes rasgos líneas filogenéticas y, por tanto, su conocimiento es útil para la sistemática (Bartnicki-García, 1968). Mayores dificultades existen para conocer como se encuentran unidos estos monómeros para formar los polisacáridos y como se unen los polisacáridos entre sí para formar la pared. Es necesario, por tanto, fraccionar o disecar los diferentes polímeros para poder estudiarlos química y físicamente, aunque en el proceso pueden cambiar o perderse otros componentes. No obstante, con paciencia y utilizando diferentes métodos, se va consiguiendo un mejor conocimiento de la pared. Un método clásico de fraccionamiento es el de Mahadavan y Tatum (1965), cuyo esquema se presenta:

Pared

NaOH 2 N	<u>1<sup>er</sup> sobrenadante</u>
16 h 25°C	$\alpha$ - (1 $\rightarrow$ 3) glucano, proteína, galactosamina.
<u>1<sup>er</sup> residuo</u>	<u>2<sup>o</sup> sobrenadante</u>
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 1 N	galactosa, manosa, glucosa, glucosamina, proteína.
16 h 90°C	
<u>2<sup>o</sup> residuo</u>	<u>3<sup>o</sup> sobrenadante</u>
NaOH 2 N	$\beta$ - (1 $\rightarrow$ 3) glucano
30 min 25°C	
Quitina	

Los polímeros más frecuentes y abundantes encontrados en las paredes de los hongos son los siguientes:

$\beta$ -(1  $\rightarrow$  3) glucano ó R-glucano. Es, posiblemente, el polisacárido que se encuentra con más frecuencia en las paredes de los hongos, y representa del 15 al 30% del contenido en polisacáridos (Mahadavan y Tatum, 1965; Wessels, 1965; Novaes-Ledieu y col., 1967; Bartnicki-García, 1968; Bull, 1970a). Aunque predominan las uniones (1  $\rightarrow$  3), Bull y Chesters (1966) y Novaes-Ledieu y col., (1967) han encontrado ramificaciones en (1  $\rightarrow$  6). El procedimiento de extracción de este glucano implica una hidrólisis suave que puede haber eliminado algunas cadenas unidas más lábilmente. También es posible que sea una mezcla de varios polisacáridos. Este polímero no ha sido encontrado en los Zigomicetos (Bartnicki-García y Reyes, 1968).

Celulosa ó  $\beta$ -(1  $\rightarrow$  4) glucano. Este polisacárido que se encuentra en la pared de todos los vegetales sólo se halla en las paredes de un grupo reducido de hongos, los Ficomietos, representando hasta un 36% (Novaes-Ledieu y col., 1967; Novaes-Ledieu y Jimenez-Martinez, 1968; Bartnicki-García, 1968). Se encuentra en forma de microfibrillas (Hunsley y Burnett, 1970). Su insolubilidad y resistencia a la hidrólisis permite su purificación fácilmente.

$\alpha$ -(1  $\rightarrow$  3) glucano ó S-glucano. Es uno de los polisacáridos más abundantes en las paredes de los Ascomietos y Basidiomicetos encontrándose en un 15-25%. (Kregar, 1954; Bacon y col., 1968; Bull, 1970a). En Schizophyllum commune se encuentra en la capa más externa de la pared (Hunsley y Burnett, 1970; Wessels y col., 1972). Es un polisacárido lineal que se extrae de la pared con álcalis. Las paredes

de Aspergillus nidulans contienen un  $\alpha$ -glucano soluble en álcali (Zonneveld, 1971). Este glucano es degradado durante la formación de los cleistotecios sirviendo como material energético para este proceso morfogénico (Zonneveld, 1972a, 1972b, 1973, 1974). Sin embargo Wessels y col. (1972) comprobaron que en otros hongos el S-glucano es un material estable.

Quitina. Es un polímeros de la N-acetil-glucosamina con uniones  $\beta$ -(1  $\rightarrow$  4). Se encuentra ampliamente distribuido en las paredes de los hongos (Bartnicki-García, 1968) exceptuando los Oomicetos y Zigomicetos. Se encuentra en forma de microfibrillas y, por tanto, participa, como la celulosa, en la formación del entramado de la pared. Su contenido oscila entre un 5% en Schizophyllum (Wessels, 1965) a un 60% en Sclerotium (Bloomfield y Alexander, 1967). En las levaduras su contenido es muy bajo y parece que está localizado en los sitios donde se ha producido la gemación (Bacon y col., 1966). En las primeras fases de la regeneración de la pared de los protoplastos se produce gran contenido de quitina (Novaes-Ledieu y García-Mendoza, 1970). Es muy resistente a la acción de los ácidos y los álcalis por lo que resulta muy fácil su purificación (Mahadavan y Tatum, 1965; García-Mendoza, y col., 1979).

Quitosano. Se diferencia de la quitina por carecer o tener muy pocos grupos N-acetilo. Hasta ahora sólo ha sido encontrado como un componente mayoritario en las paredes de Mucor y Phycomyces (Bartnicki-García, 1968). También se ha encontrado en las paredes de las basidiosporas de Agaricus (García-Mendoza y col., 1979). No obstante es posible que parte del quitosano proceda de la desacetilación de la quitina durante el proceso de purificación.

En las paredes de algunos hongos se ha encontrado galactosamina (Mahadavan y Tatum, 1965; Applegarth y Bozoian, 1969; Bull, 1970a). Es posible que se encuentre con más frecuencia de lo hasta ahora descrito ya que las dificultades para separar este azúcar de la glucosamina puede ser la causa de que en muchos trabajos no se haya detectado. Algunas especies del género Aspergillus producen polisacáridos extracelulares con contenidos de galactosamina de hasta el 70% (Leal y Rupérez, 1978).

Según Buck y sus colaboradores (1968) estos polisacáridos extracelulares son derivados de los que existen en la pared, por tanto la presencia de polímeros de galactosamina en la pared puede ser más frecuente de lo que se creía hasta ahora. Polímeros de este tipo se han aislado de las paredes de Aspergillus niger (Bardalaye y Nordin, 1976) y de las paredes de las esférulas de Physarum polycephalum (Farr y col., 1977).

En las levaduras existen polisacáridos derivados de la manosa, los mananos, que asociados a proteínas forman uno de los componentes principales de las paredes de estos microorganismos (Korn y Northcote, 1960; Sentandreu y Northcote, 1968). Proteínas (10-15%) y lípidos (5-10%) también se encuentran en las paredes de los hongos (Johnston, 1965; Bull, 1970a). La posibilidad de que estos compuestos procedan de contaminación de la membrana plasmática fue apuntada entre otros por Sentandreu y Northcote (1968). Otro importante componente de la pared es la melanina (Nicolaus y col., 1964; Bull, 1970a). Aunque en muchos hongos no es demasiado abundante, en ciertas estructuras puede llegar al 20% (García-Men-

doza y col., 1979). Se encuentra en la capa externa de la pared y hace resistentes las paredes al ataque de enzimas hidrolíticas (Bloomfield y Alexander, 1967; Bull, 1970b). También actúa protegiendo al hongo contra la deshidratación (Zhadanova y Pokhodenko, 1973) y contra las radiaciones ultravioletas (Durrell, 1964) y solares (Sussman, 1968).

Aunque son muchas las investigaciones realizadas sobre diferentes aspectos de la pared de los hongos, según Rosenberger (1975): "Existen todavía muchas lagunas en el conocimiento de la composición de las paredes y sobre las implicaciones de su organización física. Sólo las paredes de unas pocas especies han sido estudiadas y casi siempre la forma más disponible, la hifa vegetativa. Los parámetros que pueden afectar las propiedades mecánicas de una sustancia empiezan a ser estudiadas. Sin embargo, los hallazgos disponibles forman una base desde la que la meta final de la investigación sobre la pared celular, la relación entre el metabolismo de la pared y la morfología y desarrollo del organismo fúngico, puede ser apenas divisada en la lejanía".

Un caso típico de diferenciación y morfogénesis celular es la formación de esclerocios por algunos hongos. Según Willetts (1972) los esclerocios son estructuras fúngicas que, aunque muestran considerables diferencias en desarrollo y anatomía, tienen en común el poder sobrevivir periodos adversos que serían demasiado severos para las hifas vegetativas. Por tanto, sirven como un estadio de reposo resistente que, cuando las condiciones son favorables, reproducen al hongo por medio de crecimiento micelial y/o



por la producción de esporas sexuales o asexuales. La capacidad para sobrevivir de los esclerocios puede ser de años (Coley-Smith y Cooke, 1971; Willetts, 1971) lo que ocasiona serios problemas en la agricultura ya que el hongo puede mantenerse en el suelo por largos periodos de tiempo, no siendo afectado por la rotación de cultivos ni por tratamientos químicos debido a su estructura. Por ello, el conocimiento de los factores responsables de la iniciación de los esclerocios puede ser de una importancia económica considerable ya que se podrían diseñar métodos para reprimir el proceso de formación de esclerocios en las plantas infectadas y así reducir las posibilidades de supervivencia del hongo.

En los últimos años, el interés creciente en los procesos de diferenciación ha llevado a los biólogos a estudiar estos problemas básicos en diferentes sistemas. Los esclerocios de los Mixomicetos y de los hongos filamentosos están siendo, en este sentido, intensamente estudiados. Los más relevantes trabajos sobre la morfogénesis de los esclerocios en los hongos han sido revisados por Chet y Henis (1975).

El desarrollo de los esclerocios ya fue estudiado por De Bary (1887), pero fueron Townsend y Willetts (1954) quienes estudiaron mediante microscopía óptica la iniciación y estructura final de varios tipos de esclerocios. Encontraron que un esclerocio maduro de Sclerotium rolfsii, por ejemplo, está formado por cuatro capas de células distintas: a) una piel gruesa, b) una corteza formada de células anchas y tangencialmente aplastadas, c) una capa de células de pared delgada y citoplasma que se tiñe intensamente y d) una médula de hifas no muy juntas. En cuanto a su inicia-

ción distinguen tres tipos 1) terminal, formado por la ramificación activa del extremo de una hifa o de los extremos de varias hifas adyacentes. En este tipo están comprendidos: Botrytis cinerea, B. allii, Pyronema domesticum y Sclerotinia sclerotiorum. 2) Cordón o "Strand" formado por la ramificación de hifas que están unidas como en un cordón, por ejemplo, en Sclerotium rolfsii, y 3) Suelto o "loose", en este tipo las ramificaciones se entrecruzan para formar un agregado compacto de hifas. Generalmente, se diferencia una capa de células alrededor de esta masa de hifas, formando una corteza pseudoparenquimatosa, que se puede distinguir del pseudoparénquima medular.

La fisiología y metabolismo de los hongos durante la iniciación y maduración de los esclerocios han sido muy estudiados, principalmente, en Sclerotinia sclerotiorum, S. trifoliorum y Sclerotium rolfsii. Uno de los aspectos más importantes es el rápido movimiento de nutrientes a los primordios. Cooke (1971) encontró que el esclerocio maduro de Sclerotinia sclerotiorum alcanza el 88% de su peso seco a los tres días de iniciarse, lo que indica que la fase activa de crecimiento es corta. Este hongo crece bien y forma esclerocios en medios que contienen una gran variedad de azúcares: D-glucosa, D-manosa, D-fructosa, L-arabino-sa, sacarosa, rafinosa, maltosa y lactosa, mientras que no se producen esclerocios en medio con trehalosa, L-sorbosa, D-arabinosa y varios polioles. Sin embargo, cuando en el medio se combina la glucosa con trehalosa o polioles aumenta la producción de micelio y de esclerocios (Wang y LeTourneau, 1971). Al adicionar ( $^{14}\text{C}$ -) glucosa al micelio de S. sclerotiorum Cooke (1971) encontró que durante la fase

inicial del crecimiento del esclerocio la respiración es activa y se producen, en la superficie del esclerocio, gotitas de exudado ricas en carbohidratos. A los tres o cuatro días disminuye la eliminación de  $^{14}\text{CO}_2$  y la exudación.

La acumulación de carbohidratos solubles e insolubles en los esclerocios también ha sido objeto de diversos estudios. El contenido de glicógeno libre o ligado puede llegar a ser aproximadamente el 37% del peso seco de los esclerocios maduros (Ergle, 1947).

La influencia de las fuentes de nitrógeno en la producción de esclerocios ha sido menos estudiada que la de la fuente de carbono. Peiris (1947) descubrió que Botrytis cinerea no produce esclerocios en medios conteniendo nitrato amónico como única fuente de nitrógeno, mientras que los produce abundantemente con peptona, asparagina, o nitrato potásico. Démétriadés (1953) demostró que el nitrato potásico o ciertos compuestos orgánicos de nitrógeno (glicina, asparagina, tirosina, peptona, urea y los ácidos aspártico y glutámico) permiten una buena producción de esclerocios, mientras que con sales amónicas o leucina la producción es escasa. No se producen esclerocios en medios que contienen cisteína, cistina, lisina, metionina, triptófano o valina como únicas fuentes de nitrógeno. Wang y LeTourneau (1972) estudiaron el efecto de varios aminoácidos en la producción de esclerocios de Sclerotinia sclerotiorum encontrando que los más favorables son los compuestos relacionados con el ciclo de Krebs, tales como los ácidos aspártico y glutámico, alanina y serina. Chet y Henis (1975) describieron abundante formación de esclerocios en Sclerotium rolfsii en medios que contienen L-treonina, y lo atribuyeron al papel de este

aminoácido en el ciclo del ácido glioxílico.

La relación entre la fuente de nitrógeno y carbono juega un importante papel en la producción de esclerocios así como en otros aspectos de su ciclo de vida. Peiris (1947) demostró que en Botrytis cinerea aumenta la producción de esclerocios cuando aumenta la concentración de glucosa en el medio de cultivo, siempre que la concentración de peptona sea suficiente. Por el contrario, al aumentar la concentración de la fuente de nitrógeno disminuye la producción de esclerocios y aumenta la de conidios. Townsend (1952) confirmó estos resultados utilizando más hongos y varios compuestos nitrogenados. Sin embargo, anteriormente, Allington (1936) había encontrado que el número de esclerocios de Rhizoctonia solani aumenta cuando disminuye la fuente de carbono y decrece cuando disminuye la fuente de nitrógeno.

Otros factores que influyen en la producción de esclerocios son el pH, luz, grado de humedad, temperatura, etc. Los trabajos relacionados con estos aspectos fueron revisados por Hawker (1957).

Investigaciones más recientes estudian el efecto de aminoácidos que contienen azufre en la formación de esclerocios. La adición de cisteína y metionina a los cultivos de Sclerotium rolfsii inhibe la formación de esclerocios, mientras que la adición de iodoacetato, quelatos de metales o iodato potásico, antagonistas de los grupos sulfhidrilo (-SH), induce la producción de esclerocios más grandes, dispuestos en círculos concéntricos (Chet y col., 1966). Estos autores sugieren que las sustancias antes mencionadas actúan

sobre los grupos -SH de las proteínas de la pared o de alguna enzima que están implicadas en la morfogénesis. Posteriormente Chet y Henis (1968) llegaron a la conclusión de que una molécula conteniendo Cu y grupos sulfhidrilo reprime la formación de esclerocios y de que el ácido iodoacético, los agentes quelantes y el iodato potásico modifican el efecto de esta molécula obteniendo formación de esclerocios. Para Trevethick y Cooke (1971), que repitieron los experimentos anteriores, la acción de dichas sustancias químicas es indirecta y no existe una sustancia represora de la morfogénesis. Los trabajos de Wong y Willetts (1974) apoyan esta teoría. Estos autores sugieren que la estimulación de la producción de esclerocios es el resultado directo de un bloqueo de una vía metabólica importante.

Los polifenoles y las polifenol oxidasas han sido implicadas recientemente en la iniciación de los esclerocios. Wong y Willetts (1974), utilizando electroforesis en gel de poliacrilamida, estudiaron las actividades de la tirosinasa y lacasa en diferentes estadios del desarrollo del micelio y de los esclerocios de Sclerotinia sclerotiorum. No encontraron tirosinasa en el micelio aéreo o sumergido mientras que detectaron una actividad moderada en los primordios, que aumenta considerablemente durante la fase rápida de crecimiento de dichas estructuras. Durante la fase de maduración se mantiene la actividad. Detectaron lacasa en el micelio vegetativo y en todas las fases del desarrollo de los esclerocios. Encontraron las actividades más altas de fenol oxidasas en las fases anteriores a la pigmentación, lo que sugiere que las enzimas actúan en algo más que la pigmentación de la pared de las células corticales.

Un compuesto fenólico, producido por Sclerotinia sclerotiorum y S. libertiana, denominado "sclerin" fue aislado e identificado como un fenol que responde a la fórmula  $C_{13}H_{14}O_4$  (Kubota y col., 1966). Según Marukawa y col. (1975) la producción de "sclerin" se inicia durante la fase micelial, aumenta la concentración durante la iniciación del esclerocio, alcanza la concentración máxima inmediatamente después de que el esclerocio completa su desarrollo, y, a partir de este momento, inicia un descenso en la concentración. Cuando añaden "sclerin" a cultivos de S. libertiana, que no produce normalmente esclerocios, se desarrollan primordios aunque no llegan a madurar. Estos autores llegaron a la conclusión de que el "sclerin" induce la formación de los primordios y la melanogénesis de los esclerocios.

La formación sincrónica de esclerocios en S. rolfsii se ha conseguido recientemente al añadir 0,5% (p/v) de lactosa a un medio sintético que contiene glucosa. Los esclerocios se forman en una banda circular al margen de la colonia. La capacidad de conseguir un desarrollo sincrónico de los esclerocios permitirá una mejor comprensión de la estructura y de los cambios bioquímicos que preceden y acompañan a este tipo de morfogénesis. Se desconoce como la lactosa puede originar la formación sincrónica de los esclerocios. Es posible que la lactosa inhiba el crecimiento apical y estimule la ramificación. Estudios de incorporación autorradiográfica muestran claramente cambios en la distribución de vesículas y en la síntesis de la pared en presencia de lactosa. La compleja, pero regular morfología del esclerocio debe implicar reacciones intercelulares, quizás por contacto físico y/o por intercambio metabólico entre las células

de los alrededores. Existen similitudes entre la formación de los esclerocios y la formación del rizomorfo de algunos hongos, por una parte, y la formación de los basidiocarpos y ascocarpos en hongos superiores por otra (Smith y Berry, 1976).

El estado conidial de B. cinerea es un hongo: muy generalizado que causa enfermedades características en muchos vegetales a través de todo el mundo, especialmente bajo condiciones de humedad y frío (Chupp y Sherf, 1960; Walker, 1952). Es capaz de atacar a las judías en diferentes estados de crecimiento y también causa una importante enfermedad después de la recolección en la mayoría de las áreas de cultivo de judías del mundo (Zaumeyer y Thomas, 1957).

En el estado de Nueva York B. cinerea produce en las judías una enfermedad endémica que aparece todos los años. Sin embargo, en algunas ocasiones, dicha enfermedad ha alcanzado proporciones de verdadera epifitía durante los periodos de lluvia en campos de judías rodeados de árboles frutales o bosques, donde el movimiento de aire es pequeño y persiste gran humedad por largos periodos de tiempo. A consecuencia de ello, los granjeros de Nueva York se han visto forzados a utilizar fungicidas para aminorar las pérdidas ocasionadas por la enfermedad.

B. cinerea también ataca a tomates, lechugas, fresas, cerezos, viñas, avena, etc.

La relación entre B. cinerea y Botryotinia fuckeliana (un discomiceto operculado) ha sido demostrada por Groves y Drayton (1939), Groves y Loveland (1953) y Polach y Abawai (1975).

El estado conidial, B. cinerea, consiste en un micelio cenocítico que produce esporas asexuales y esclerocios (agregaciones de hifas rugosas, negras e irregulares). Los esclerocios resisten condiciones ambientales adversas y el hongo probablemente pasa el invierno en esta forma para proporcionar colonias frescas y esporas en primavera. Las esporas más grandes (macroconidios) se diseminan fácilmente para infectar nuevas plantas. Las esporas más pequeñas (microconidios), probablemente, funcionan como los espermacios en la reproducción sexual. El estado perfecto puede derivarse de los esclerocios al aplicar conidios a su superficie (los cultivos de B. cinerea son heterotálicos). Los esclerocios fertilizados a veces dan lugar a apotecios pedunculados que contienen ascas.

Recientemente se ha descrito la producción de polisacáridos extracelulares por diferentes cepas de B. cinerea. Kamoen y Jamart (1973a) aislaron un polisacárido del caldo de cultivo de B. cinerea cuando crece en el medio de Richards. El polisacárido está formado de galactosa, glucosa, manosa y ramnosa. Las soluciones acuosas comprendidas entre 0,01 y 1% de polisacárido tienen un efecto tóxico sobre las hojas de begonias. El efecto tóxico se debe al ácido cítrico segregado in vitro por el B. cinerea que actúa como una toxina sobre las hojas de las begonias (Kamoen y Jamart, 1973b). Dubordieu y col., (1978a) encontraron un glucano producido por B. cinerea en uvas infectadas. Dicho polisacárido tiene un peso molecular aproximado de un millón. Es un  $\beta$ -glucano con enlaces  $1 \rightarrow 3$ , en la cadena principal, y ramificaciones en  $1 \rightarrow 6$ . Este glucano es responsable de las dificultades que se originan en la clarificación



de los vinos. En las uvas infectadas se localiza entre la epidermis y las células de la pulpa (Dubordieu y col., 1978b).

El objeto de esta Tesis es el estudio de la composición química, estructura y fisiología de la producción del polisacárido extracelular de Botrytis cinerea y su posible participación en la formación y estructura de los esclerocios.

## MATERIALES Y METODOS

### I.- MICROORGANISMO

El presente trabajo se ha realizado con el hongo filamentoso Botrytis cinerea Pers. ex Fr. aislado en nuestro laboratorio como contaminante y confirmada su identidad por el Centraalbureau voor Schimmelcultures de Baarn (Holanda).

B. cinerea Pers. ex Fr. pertenece a la clase Deuteromycetes, orden Moniliales, familia Moniliaceae. Produce apotecios cuando se cruzan algunas cepas. En estado perfecto ha sido identificado como género Botryotinia fuckeliana (de Bary) Whetz perteneciente a la clase Ascomycetes, orden Helotiales, familia Sclerotinaceae.

De Bary (1866) fue el primero que descubrió que el ascomiceto Peziza fuckeliana, encontrado por él, y el Botrytis cinerea son diferentes estados del mismo hongo. El género Botryotinia fue creado por Whetzel (1945). La relación entre Botrytis cinerea y Botryotinia fuckeliana fue confirmada por Groves y Drayton (1939) y Groves y Loveland (1953).

### II.- MEDIOS DE CULTIVO

#### 1.- Medio de mantenimiento y de formación de esclerocios

El microorganismo se mantiene en tubos inclinados que contienen un medio formado por un cocimiento de 1 parte de judías verdes y 2 partes de agua y al que se añade 2% de agar, una vez filtrado.

Para la formación de esclerocios se emplea el mismo medio enriquecido con 1% de glucosa y distribuido en porciones de 40 ml en placas Petri de 10,5 cm de diámetro. Las placas se inoculan extendiendo dos gotas de una suspensión de conidios sobre la superficie del medio y se incuban en oscuridad

a temperatura ambiente.

A los 15 días de incubación se recogen los esclerocios teniendo cuidado de eliminar el agar, se secan y limpian con un papel de filtro, y se pesan (peso húmedo). Después de sumergirlos en agua hirviendo durante 3 minutos para eliminar restos de agar los esclerocios se desecan en estufa de aire caliente a 50°C hasta peso constante (peso seco).

2.- Germinación de esclerocios.- Los esclerocios se recogen a los 15 días de incubación y se llevan asépticamente a placas estériles. Las placas se mantienen a -11°C durante 24 horas y después se incuban a temperatura ambiente cerca de una ventana en cámara húmeda. Bajo estas condiciones, los esclerocios reciben luz directa del sol durante 1 hora diaria, aproximadamente. Algunos conidióforos aparecen a los 10 días y hacia el día 20 la mayoría de los esclerocios están cubiertos por conidióforos. En este momento los esclerocios se tratan para examinarlos al microscopio electrónico o para estudiar su composición.

3.- Medio base para la producción de polisacárido extracelular.- El medio sintético utilizado para el crecimiento del hongo y la producción de polisacárido es el siguiente:

Glucosa .....	20	g
Casaminoácidos (Difco).....	4	g
$\text{KH}_2\text{PO}_4$ .....	0,5	g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ .....	0,5	g
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ .....	0,5	mg
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ .....	0,5	mg
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ .....	0,5	mg
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ .....	0,02	mg
$\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ .....	0,02	mg
Tiamina .....	1	mg
Agua destilada .....	1	l

Los cambios en las fuentes de carbono y nitrógeno, así como en sus concentraciones, se detallarán en los distintos experimentos. El medio se ajusta a pH 6,5, se reparte en matraces Erlenmeyer que se tapan con algodón y se esteriliza en autoclave a 120°C durante 15 minutos.

Como inóculo se emplea una gota de una suspensión de conidios de B. cinerea.

Para los estudios fisiológicos se utilizan matraces de 250 ml con 25 ml de medio que se incuban estáticamente a 25°C<sup>±</sup> 1. Las muestras se toman por duplicado a distintos tiempos de incubación.

Para la formación de polisacárido se utilizan matraces de 2 l con 1 l de medio basal, se incuban a 25°C y a 100 r.p.m. en un incubador orbital Gallenkamp IH-465.

### III.- AISLAMIENTO DEL POLISACARIDO EXTRACELULAR

Los líquidos de cultivo se separan del micelio filtrando a través de una tela de algodón. En una pequeña parte de estos líquidos metabólicos se mide el pH y se determina glucosa residual. Al resto se añade 1 vol de metanol o etanol y el polisacárido se separa como un precipitado fibroso y cohesivo que se rocege con una espátula. Este material se lava dos veces con alcohol y se deseca a 60°C hasta peso constante.

### IV.- AISLAMIENTO DEL POLISACARIDO PROCEDENTE DE ESCLEROCIOS

Los esclerocios formados en el medio basal enriquecidos con 1% de glucosa se recogen a los 15 días de inocular las placas, se desecan y se extraen sucesivamente con agua a temperatura ambiente, agua a 100°C y NaOH 1M a 60°C para estudiar la composición del polisacárido procedente de los mismos.

Fracción 1 (agua a temperatura ambiente). Los esclerocios desecados (3 g) se machacan en un mortero que contiene un poco de agua destilada, durante el proceso se añade más agua hasta conseguir un volumen de 200 ml y la suspensión se centrifuga. El líquido sobrenadante se mezcla con un volumen de metanol o etanol y se recoge el precipitado. El sedimento se lleva de nuevo al mortero y se repite el proceso anterior hasta que no se forme más precipitado al añadir metanol. Los precipitados se juntan y se lavan con alcohol del 50%.

Fracción 2 (agua a 100°C) El residuo procedente de la fracción 1 se lleva al mortero y se extrae con 200 ml de agua caliente. La suspensión se mantiene a 100°C durante 10 minutos. Después se centrifuga, el sobrenadante se trata con

un volumen de metanol y se recoge el precipitado formado. El proceso se repite hasta que no se obtiene más precipitado. Los precipitados de estas extracciones se lavan con alcohol del 50%.

Fracción 3 (NaOH 1M) El residuo procedente de la extracción con agua caliente se lleva al mortero y se suspende en 200 ml de NaOH 1M, la suspensión se mantiene a 60°C durante 15 minutos. El sobrenadante se trata con 1 vol de metanol y se continua la extracción hasta que no haya más formación de precipitado. Los precipitados se lavan con alcohol del 50% hasta que el sobrenadante no de reacción alcalina.

Fracción 4 Esta fracción comprende el residuo insoluble de las extracciones anteriores. El residuo se lava con agua hasta que quede libre de álcali, a continuación con alcohol absoluto y por último con acetona.

#### V.- ANALISIS QUIMICO

1.- Determinación de carbohidratos totales.- Se ha utilizado el método de la antrona (Loewus, 1952). La reacción se funda en que el ácido sulfúrico concentrado hidroliza en caliente los carbohidratos, presentes en la muestra, produciendo además deshidratación intramolecular de los monosacáridos formados. Las pentosas dan lugar a furfural y las hexosas a 5-hidroxi-metil-2-furfural, que reaccionan con los grupos fenólicos de la antrona para dar lugar a complejos coloreados cuya intensidad de color es proporcional a la cantidad de carbohidratos del problema.

**Reactivo:**

Solución de antrona (9,10-dihidro-9-oxo-antraceno) 0,2% en  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado (p/v); el  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado se añade agitando y enfriando en baño de hielo. La solución se prepara en el momento de ser utilizada porque no es estable.

**Procedimiento:**

La solución problema, conteniendo de 20 a 200  $\mu\text{g}$  de carbohidratos, se completa con agua destilada hasta 1,5 ml se le añaden 3 ml del reactivo en frío y se agita. A continuación se introduce en agua hirviendo durante diez minutos, se deja enfriar y se mide la absorbancia frente a un blanco a 540 nm.

Para la curva patrón se utiliza una solución de glucosa, o del azúcar que contiene el problema, a una concentración de 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . 100 mg de una solución de glucosa dan una lectura de 0,45.

2.- Determinación de proteína total. - Se ha utilizado el método de Lowry y col. (1951). La reacción se basa en la oxidación, catalizada por el cobre, de los aminoácidos aromáticos y otros grupos presentes en la proteína, por un reactivo de tipo heteropolifosfato (reactivo fosfomolibdico-fosfotúngstico).

**Reactivos:**

- A) Carbonato sódico al 10% en hidróxido sódico al 0,1%
- B) Sulfato de cobre al 0,5%
- C) Tartrato sódico-potásico al 1%
- D) Mezcla de 50 ml de A + 0,5 ml de B + 0,5 ml de C

Se prepara en el momento de ser utilizado.

E) Reactivo de Folin-Ciocalteu en proporción 1:1 con agua destilada.

Procedimiento:

La muestra a analizar conteniendo de 20 a 100  $\mu\text{g}$  de proteína se completa a 0,6 ml con agua destilada y se le añade 3 ml de reactivo D. Se deja reposar durante 10 minutos a temperatura ambiente, se agita y se le añade 0,3 ml de reactivo E, se agita de nuevo y antes de hacer la lectura se deja 30 minutos en reposo. La absorbancia se mide a 750 nm frente a un blanco en el que el problema ha sido sustituido por agua destilada.

La curva patrón se hace con seroalbúmina bovina, (200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) a partir de la cual se toman distintas muestras comprendidas entre 0,1 y 0,5 ml, y se completan a 0,6 ml con agua destilada. La concentración de proteínas se calcula por comparación del problema con la curva patrón. 40  $\mu\text{g}$  de la solución patrón dan una lectura de 0,14.

3.- Determinación de ion fosfato.- Para la determinación del ion fosfato se ha seguido el método de Lowry y López (1946). La reacción se basa en que el molibdato añadido a la muestra reacciona con el fosfato de la misma formando fosfomolibdato que al unirse con el ácido ascórbico (sustancia reductora) da óxidos de molibdeno de color azul, cuya densidad óptica depende de la concentración de fosfato presente en la muestra. La reacción se hace en tampón acetato a pH 4.



**Reactivos:**

- Acido ascórbico 0,1 g en 10 ml de agua destilada (preparar en el momento y mantener en baño de hielo).
- Molibdato amónico 1 g en 100 ml de  $H_2SO_4$  0,05N.
- Tampón acetato. Para preparar el tampón acetato se añade acetato sódico 0,025N a una solución de ácido acético 0,1N hasta llevarla a pH 4.

**Procedimiento:**

A la muestra, que contiene de 10 a 100  $\mu g$  de fosfato y que se completa a 1 ml con agua destilada, se le añaden 4 ml de tampón acetato, 0,5 ml de ácido ascórbico y 0,5 ml de molibdato amónico. Se deja reposar durante 15 minutos y se lee la absorbancia a 700 nm frente a un blanco con agua.

La curva patrón se hace con  $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$  138 mg/100 ml (10  $\mu moles/ml$ ) diluyendo a 1/10 y tomando distintas concentraciones comprendidas entre 0,1 y 0,9  $\mu moles$ . 0,30  $\mu moles$  de solución patrón dan una lectura de 0,235.

4.- Determinación de aminoazúcares.- Los aminoazúcares se han determinado por el método, algo modificado, de Rondle y Morgan (1955). La reacción se basa en la formación de un material cromogénico, cuando los derivados N-acetilados de los aminoazúcares se calientan en baño a 100°C en solución alcalina.

El cromógeno produce un cromóforo o cromóforos al tratarlo en solución ácida con P-dimetilaminobenzaldehído etanólico. Las condiciones de pH durante la condensación con acetil-acetona, conducen a marcadas diferencias en la intensidad del color final. Por esta razón es conveniente

eliminar bien el HCl de los hidrolizados de polisacáridos antes de hacer una determinación de aminoazúcares.

Reactivos:

- Reactivo de acetyl-acetona. 1 ml de acetyl acetona se disuelve en 50 ml de carbonato sódico 0,5N. El reactivo se prepara antes de cada determinación y es estable por 2 ó 3 horas a 18°C.

- Reactivo de Ehrlich. 0,8 g de P-dimetilaminobenzaldehído se disuelven en 30 ml de etanol y se le añaden 30 ml de HCl concentrado. La solución deberá ser de color amarillo pálido y carecer de material insoluble. Se mantiene bien a temperatura ambiente en frasco tapado.

Procedimiento:

La muestra, conteniendo de 20 a 200 µg de aminoazúcar, se completa a 1 ml con agua destilada y se le añade 1 ml del reactivo de acetyl-acetona. El contenido de los tubos se mezcla bien y la pared de cada tubo se lava con 1 ml de agua destilada.

Los tubos se cierran con ampollas o canicas, que actúan como tapones evitando pérdidas de acetyl-acetona, y se calientan en baño de agua hirviendo durante 20 minutos.

Se enfrían a temperatura ambiente y se añaden 2 ml de etanol, seguidos por 1 ml del reactivo de Ehrlich (volumen total 6 ml). El contenido del tubo se mezcla suavemente y se calienta 10 minutos en baño a 65-70°C para acelerar la liberación de CO<sub>2</sub>. El calentar por encima de 70°C conduce a una disminución de la intensidad final del color. Después de enfriar a temperatura ambiente, el contenido de los tu-

bos se mezcla nuevamente y se mide la absorbancia a 530 nm frente a un blanco con agua. La curva patrón se hace con una solución de aminoazúcar (1 mg/ml) tomando concentraciones de 50 µg a 200 µg. 100 µg de la solución de glucosamina dan una lectura de 0,595.

Las intensidades de color guardan una relación lineal con la cantidad de aminoazúcar presente entre 50 y 200 µg. El método descrito sólo es apropiado para la determinación de aminoazúcares libres.

5.- Determinación de azúcares reductores.- Los azúcares reductores se han determinado por el método de Somogyi (1952) y Nelson (1944). Este método se basa en la reducción del reactivo de cobre, en medio alcalino, por los azúcares reductores, y en la determinación del cobre reducido que da compuestos coloreados al reaccionar con reactivos de arsenomolibdato. El color obtenido es proporcional a la concentración de azúcares reductores presentes en el problema.

Reactivos:

a) Reactivo de Somogyi

- 24 g de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  anhidro + 12 g de tartrato sódico potásico (sal de Rochelles) se disuelven en 250 ml de agua destilada.

- 4 g de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  se disuelven en 40 ml de agua. A esta solución se le añade la anterior agitando.

- Sobre la mezcla se agrega lentamente 16 g de  $\text{NaHCO}_3$

- 180 g de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro se disuelven en 500 ml de agua caliente y se hierve para eliminar el aire. Una vez frío, se mezclan las distintas soluciones a 30°C en la oscuridad. Al cabo de este tiempo se filtra y se guarda en frasco color topacio.

#### B) Reactivo de Nelson

- 25 g de molibdato amónico se disuelven en 450 ml de agua y se le añaden 21 ml de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado.
- 3 g de arseniato disódico ( $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) se disuelven en 25 ml de agua.

Ambas soluciones se mezclan agitando. La mezcla se mantiene durante 48 horas a  $37^\circ\text{C}$  y a oscuras. Se guarda en frasco color topacio.

#### Procedimiento:

A la muestra que contiene de 10 a 80  $\mu\text{g}$  de azúcar reductor y que se completa a 0,4 ml con agua destilada se le añade 0,4 ml del reactivo de Somogyi. Se mete en baño de agua hirviendo durante 15 minutos, se enfría y se le añade 0,4 ml del reactivo de Nelson. Se enrasa a 6 ml con agua y se agita bien. La absorbancia se lee a 540 nm (El Zn interfiere en la determinación).

La curva patrón se hace con una solución de glucosa 1mM (18 mg/100 ml), tomando distintas cantidades comprendidas entre 0,1 y 0,4 ml. 36  $\mu\text{g}$  de glucosa dan una lectura de 0,36.

6.- Determinación de ácidos hexurónicos.- Para la determinación de ácidos hexurónicos se ha empleado el método de Dische (1947). Este método se basa en dos reacciones: 1) la descomposición del ácido hexurónico, presente en la muestra, por el  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado formando productos intermedios (ácido 5-formilfuróico principalmente), y 2) la reacción coloreada de estos productos intermedios, que aún conservan el carbono carbonílico, con carbazol.

**Reactivos:**

- $H_2SO_4$  concentrado
- Solución alcohólica al 0,1% de carbazol

**Procedimiento:**

A 1 ml de la solución problema que contiene de 5 a 100  $\mu g$  de ácido urónico se le añaden, sobre baño de hielo, 6 ml de  $H_2SO_4$  concentrado. La mezcla se calienta durante 20 minutos en baño de agua hirviendo, se enfría a temperatura ambiente y se le añade, agitando, 0,2 ml de una solución alcohólica al 0,1% de carbazol puro. Después de unos minutos aparece un color rosa, cuya intensidad aumenta en las 2 primeras horas, y permanece invariable durante una hora más. Al cabo de este tiempo el color disminuye lentamente y pierde 1/3 de su intensidad en 24 horas.

Se lee la absorbancia a 530 nm. Se utilizan controles de ácido galacturónico. 100  $\mu g$  dan una lectura de 0,46.

La absorbancia debida a la reacción de los azúcares verdaderos con el carbazol puede ser fácilmente deducida, cuando se conocen la naturaleza del azúcar y su concentración aproximada, usando una solución patrón de azúcar en cada determinación.

7.- Determinación de lípidos.- Los lípidos se han determinado siguiendo el método empleado por Bartnicki-García y Nickerson (1962).

a) Lípidos libres: 100 mg de la muestra a analizar se agitan junto con 50 ml de una solución formada por etanol al 95% y éter etílico (v/v) durante 24 horas a 30°C. La fase solvente, que contiene los lípidos, se separa filtrando a través del papel. Se hacen tres extracciones y a continuación

el residuo se trata dos veces con cloroformo. Se juntan todos los extractos y se desecan al vacío. De este material se extraen los lípidos con éter, se desecan con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro y se evapora el éter. El residuo se deseca a vacío a 45-50° y se pesa. Esta fracción constituye los lípidos libres.

b) Lípidos ligados: Estos lípidos se liberan al atacar el residuo de la extracción anterior con una solución de etanol ácido y éter (1 ml de HCl 12N se diluye a 100 ml con 95% de etanol-éter etílico (v/v)). La digestión se lleva a cabo durante 5 h a 50°, a continuación se extrae dos veces con una solución de etanol al 95% y éter etílico (v/v) y una con cloroformo; cada extracción dura 24 h. Se juntan los extractos y se tratan como en el caso de los lípidos libres.

8.- Extracción de carbohidratos solubles en alcohol.- Los azúcares solubles en alcohol se extraen tratando una masa de esclerocios pulverizados con etanol al 80% bajo reflujo durante 30 minutos. Los extractos se desecan y el residuo se extrae con 2 ml de piridina a 60°, la extracción se repite cuatro veces para separar los azúcares de otras sustancias. Se juntan los extractos, se desecan y pesan. Los azúcares solubles en alcohol se identifican por cromatografía en papel usando como solvente acetato de etilo: ácido acético: ácido fórmico: agua (18:3:1:4). El tiempo de elución es de 16 h. y las manchas se revelan con nitrato de plata. Estos azúcares también se identifican por cromatografía de gases una vez acetilados. Para acetilarlos se tratan con 1 ml de una mezcla de piridina y anhídrido acético (1:1).

## VI ANALISIS ESTRUCTURAL

1.- Hidrólisis química. - Los polisacáridos se hidrolizan con ácido clorhídrico de distintas concentraciones y durante distintos tiempos a 105°C. En los tubos de hidrólisis se hace el vacío con bomba de agua (-60 cm) para evitar que se oxiden los productos resultantes. El exceso de ácido se elimina lavando los hidrolizados con 1 ml de agua destilada 2 ó 3 veces y calentando a 40-50°C en desecador con vacío sobre pentóxido de fósforo y lentejas de sosa. Los hidrolizados, una vez neutralizados, se resuspenden en agua destilada, de modo que la concentración final sea en todos los casos de 10 mg/ml del producto inicial.

2.- Cromatografía en papel. - El método de separación de azúcares por cromatografía en papel es muy antiguo y bien fundado. La mayoría de las veces se utiliza la cromatografía descendente. Las manchas separadas se pueden detectar por una amplia variedad de métodos. En general, cantidades menores a 5 µg no se detectan. Los hidrolizados de polisacárido disueltos en agua (10 mg/ml), se aplican sobre el papel de cromatografía mediante micropipetas. Las cantidades empleadas están comprendidas entre 50 y 100 µl. Como control se han utilizado 40 µl de distintas soluciones de azúcares y aminoazúcares (1 mg/ml).

El papel de cromatografía utilizado ha sido el Whatman nº 1. Para conseguir mejor separación de los azúcares neutros el papel se ha tamponado con tampón fosfato sódico-potásico 0,066M, pH 5,5.

Solventes:

1) Para azúcares: n-butanol-acetona-agua (4:5:1). Tiempo de elución 48 h.

2) Para aminoazúcares: n-butanol-piridina-HCl 0,1 N (5:3:2). Tiempo de elución 24-48 h.

Reactivos para revelado:

1) Ftalato de anilina. Se utiliza para la identificación de azúcares neutros. Se disuelven 0,93 g de anilina y 1,66 g de ácido ftálico en 100 ml de n-butanol saturado de agua. Se pulveriza el cromatograma y se calienta en estufa a 105°C durante 5 minutos. Los azúcares neutros dan mancha color marrón (Dawson y col., 1962).

2) p-dimetilaminobenzaldehído. Se utiliza para la identificación de aminoazúcares.

Se preparan 3 soluciones:

- a) 0,5 ml de acetyl-acetona en 50 ml de n-butanol
- b) 5 ml de KOH al 50% en 20 ml de etanol
- c) Reactivo de Ehrlich. A 1 g de p-dimetilaminobenzaldehído se añaden 30 ml de etanol, 30 ml de HCl concentrado y 180 ml de n-butanol. La solución se agita bien y se guarda en frasco tapado a temperatura ambiente.

Se mezclan 10 ml de la solución a) y 0,5 de la solución b) y se pulveriza el papel. A continuación se calienta a 105°C, 5 minutos. Se pulveriza con el reactivo de Ehrlich y se calienta el papel a 90°C, 5 minutos.

Para la identificación de N-acetilhexosaminas no es necesaria la condensación previa con la acetylacetona.



Las hexosaminas dan manchas de color rojo cereza y las N-acetilahexosaminas de color púrpura (Dawson y col., 1962).

3) Nitrato de plata amoniacal-NaOH (Hough y Jones, 1962). Se utiliza para identificar azúcares y aminoazúcares. A 0,5 ml de una solución acuosa saturada de nitrato de plata se le añade 100 ml de acetona; se forma un precipitado blanco que se disuelve por la adición de agua destilada gota a gota. El papel se sumerge en este reactivo y se deja secar 3 a 4 minutos. A continuación los papeles se pulverizan con NaOH 0,5N en etanol acuoso, preparado diluyendo una solución acuosa al 40% de NaOH con etanol. Los azúcares reductores forman rápidamente manchas marrones o negras; muchos carbohidratos o derivados de carbohidratos pueden ser detectados con este reactivo. Después de 5 ó 10 minutos el papel se sumerge en amoníaco con agua (proporción 1:3), se lava rápidamente con agua corriente de 15 a 30 minutos y a continuación se seca.

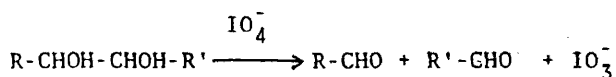
Otra modalidad consiste en sustituir el amoniaco-agua por una solución de tiosulfato sódico al 5%. En este caso se seca directamente sin necesidad de lavar con agua.

3.- Cromatografía de gases. - Para analizar por cromatografía de gases los azúcares, solubles en alcohol, se acetilan tratándoles con 1 ml de una solución de piridina: anhídrido acético (1:1). Se tapa el tubo y se mantienen durante 1 hora a 100°C. El contenido del tubo se evapora a sequedad en el rotavapor, se lava con agua dos veces y se disuelve en 1 ml de cloroformo quedando listo para inyectar en el cromatógrafo de gases. Los acetatos de alditol se han analizado a 180° y 220° en un cromatógrafo de gases Perkin-Elmer-F11 sobre columnas.

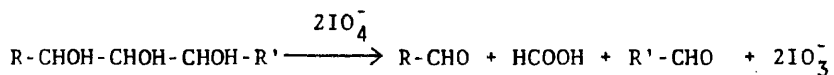
Las asignaciones de los picos se hacen al coincidir el problema con los tiempos relativos de retención de los controles a las dos temperaturas.

4.- Oxidación de polisacárido con periodato sódico.-

Cuando los hidratos de carbono con 2 grupos hidroxilo contiguos y libres se tratan con ácido periódico ó con alguna de sus sales, la cadena carbonada se rompe entre los dos grupos hidroxilo, formando dos grupos aldehídicos y consumiendo una molécula de periodato.



En el caso de los  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  trioles ocurre una doble ruptura de la cadena carbonada formándose dos grupos aldehídicos, una molécula de ácido fórmico y dos moléculas de periodato.



Por tanto, un polisacárido con unidades terminales no reductoras o unidades no terminales con uniones  $1 \rightarrow 6$ , que tenga tres grupos hidroxilo contiguos libres, necesitará dos moléculas de periodato para romperse y dar una molécula de ácido fórmico (Fig. 1).

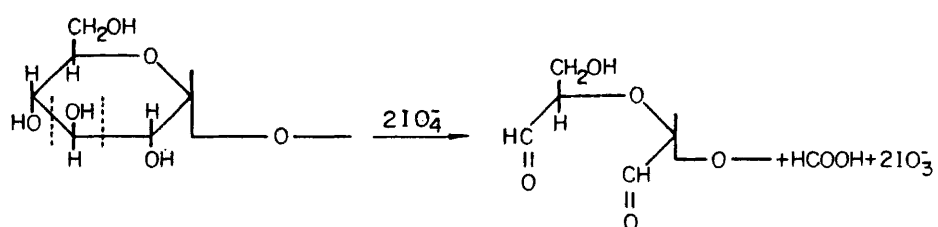
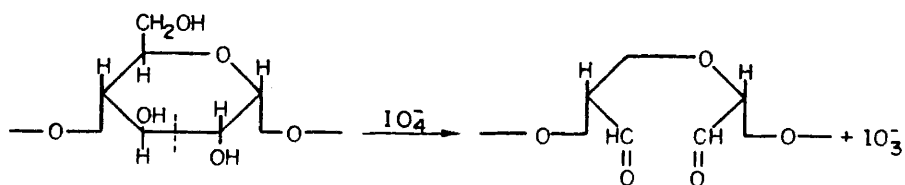


Fig. 1. Unidad terminal no reductora

Las unidades no terminales unidas por enlaces  $1 \rightarrow 2$  ó  $1 \rightarrow 4$  se rompen al tratarlas con una molécula de periodato, no liberando ácido fórmico (Fig. 2).

Fig. 2. Unidad no terminal con unión en  $\text{C}_4$

Las uniones que no poseen grupos hidroxilo contiguos libres tales como las unidades no terminales unidas por enlaces  $1 \rightarrow 3$  ó unidades con ramificaciones en los carbonos 2 y 4 no son afectadas por el periodato.

Las unidades terminales reductoras unidas por enlaces  $1 \rightarrow 2$  ó  $1 \rightarrow 3$  se rompen sin liberar ácido fórmico, cuando se tratan con una molécula de periodato (Fig. 3)

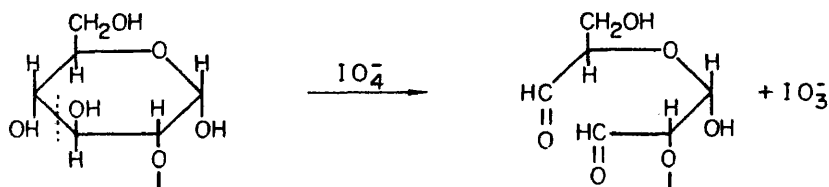


Fig.3. Unidad terminal reductora con unión en  $\text{C}_2$

Las unidades terminales reductoras unidas por enlace  $1 \rightarrow 4$ , consumen 2 moléculas de periodato liberando una molécula de ácido fórmico. (Fig. 4).

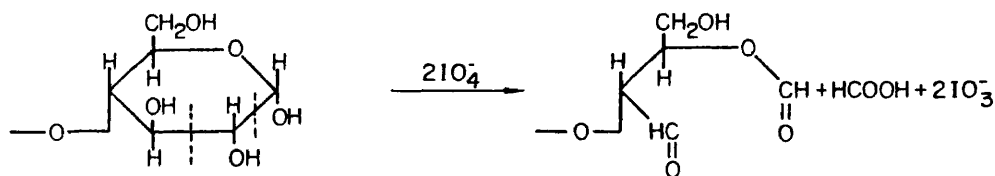


Fig. 4. Unidad terminal reductora con unión en  $\text{C}_4$

Las unidades terminales reductoras unidas por enlace 1  $\rightarrow$  6 consumen 3 moléculas de periodato, produciendo 2 moléculas de ácido fórmico (Fig. 5).

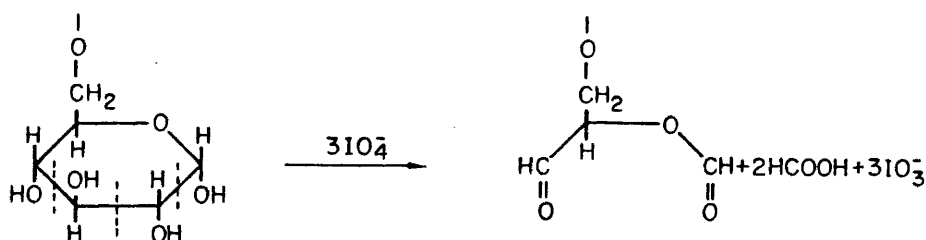
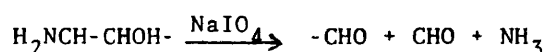


Fig. 5. Unidad terminal reductora con unión en C<sub>6</sub>

El periodato oxida los aminoazúcares rompiendo los enlaces carbono-carbono y liberando una molécula de NH<sub>3</sub>



Según lo expuesto anteriormente, al oxidar un polisacárido la determinación cuantitativa de los moles de periodato consumidos, el ácido fórmico liberado y la proporción de las unidades de azúcar no atacadas nos dan información sobre la naturaleza y proporción de los enlaces glicosídicos presentes en el polisacárido.

La oxidación del polisacárido de *B. cinerea* y la determinación del periodato consumido se hizo según el método de Aspinall y Ferrier (1957).

Reactivos:

- solución de periodato sódico 0,03M
- solución patrón de glucosa 3,33  $\mu\text{moles/ml}$

Procedimiento:

100 ml de una suspensión de polisacárido (1 mg/ml) se mezcla con 100 ml de la solución 0,03M de periodato sódico (la solución queda 0,015M) y se mantiene en la oscuridad a temperatura ambiente.

Periódicamente se toman 20  $\mu$ l de cada uno de los problemas y de la solución control de glucosa, se diluyen 250 veces y se lee a 223 nm frente a un blanco de periodato sódico.

a) Valoración del ácido fórmico con periodato sódico, en la mezcla de oxidación (Hay y col., 1965).- El ácido fórmico, producido en la oxidación del polisacárido con periodato sódico, se determina por titulación directa con NaOH 0,01M. Antes de la valoración, se destruye el exceso de periodato añadiendo 1 ml de etilenglicol a 10 ml de la mezcla de oxidación del polisacárido y a un blanco de reactivo. Se deja en reposo 1 hora.

Para la valoración del ácido fórmico se utiliza NaOH 0,01M (previamente titulada con ftalato ácido de potasio, indicador fenolftaleína) usando como indicador rojo de metilo. La diferencia de acidez entre el blanco y la muestra representa el ácido fórmico liberado en la oxidación del polisacárido.

b) Determinación del formaldehído mediante periodato sódico, en la mezcla de oxidación (Kabat y Mayer, 1961).- El exceso de periodato se destruye por la adición de arsenito. El formaldehído producido en la oxidación del polisacárido se valora con ácido cromotrópico (ácido 1,8-dihidroxi-naftalén-3,6-disulfónico).

**Reactivos:**

- Acido cromotrópico. A 100 mg de ácido cromotrópico se le añaden 25 ml de agua destilada y 30 ml de  $H_2SO_4$  concentrado. Se guarda en frasco color topacio. La solución dura dos ó tres semanas.

- HCl 4N

- Arsenito 0,4M

**Procedimiento:**

A 50  $\mu$ l de solución de polisacárido que ha sido oxidada con periodato, se le añaden 10  $\mu$ l de HCl 4N, y 40  $\mu$ l de arsenito 0,4M. Al añadir el arsenito se forma color amarillo por la liberación de iodo. Se deja reposar 5 minutos. Se añade 1 ml del reactivo de ácido cromotrópico, se agita y se meten los tubos en baño a 100°C durante 30 minutos. Al cabo de este tiempo se lee la absorbancia frente a un blanco con agua a 570 nm. Se pone también un blanco con periodato. El color rosa-violeta formado es estable por más de 4 horas.

Para la curva patrón se prepara una solución de formaldehído (25  $\mu$ g/ml) a partir de la cual se toman de 10 a 30  $\mu$ l completando a 0,1 ml con 25  $\mu$ l de periodato sódico 0,03 M, 5  $\mu$ l de HCl 4N, 40  $\mu$ l de arsenito 0,4M y agua destilada. 0,50  $\mu$ g dieron una lectura de 0,164. La concentración de formaldehído en el problema se calcula por comparación con la curva patrón.

5.- Reducción e hidrólisis del polisacárido oxidado con periodato sódico (degradación de Smith).- Tiene por objeto convertir los dialdehídos, resultantes de la oxidación con periodato, en alcoholes, por ser éstos más estables a la hi-

drólisis ácida. Se siguió el método de Sietsma y Wessels (1977).

Reactivos:

- Tetrahidruoborato de sodio ( $\text{NaBH}_4$ )
- Acido acético glacial
- HCl concentrado

Procedimiento:

La suspensión de polisacárido oxidado con periodato sódico se dializa durante 24 horas, frente a agua destilada, para eliminar las sales inorgánicas.

A 100 ml de la solución dializada, conteniendo el polisacárido oxidado, se le añaden 75 mg de  $\text{NaBH}_4$  y se deja que tenga lugar la reducción durante 16 horas a  $18^\circ\text{C}$  (temperatura ambiente).

A continuación se añade ácido acético para naturalizar la solución y se dializa de nuevo frente a agua destilada durante 24 horas.

La solución dializada se concentra a la mitad de su volumen en rotavapor, se añade etanol (v/v), y el polisacárido precipitado es recogido por centrifugación, lavado con etanol y acetona, y desecado en estufa a  $70^\circ\text{C}$  hasta peso constante.

El polisacárido, oxidado y reducido, se hidroliza con HCl 2N y 4N (10 mg/ml), durante 2 horas en estufa a  $105^\circ\text{C}$  habiendo hecho el vacío en el tubo de hidrólisis para evitar la oxidación de los productos resultantes.

El HCl se elimina de los hidrolizados por evaporación en cámara desecadora a  $40^\circ\text{C}$  con vacío, y se lavan con  $\text{H}_2\text{O}$  hasta pH neutro.



Para eliminar restos de sales, se hace extracción de azúcares y aminoazúcares del hidrolizado con piridina (0,5 ml), y cromatografía en papel para identificar los productos resultantes de la hidrólisis. Como control se utilizan soluciones de: glucosa, manosa, galactosa, glucosamina (1 mg/ml) glicerol (4 mg/ml), y treitol (2 mg/ml). Como solvente se utiliza n-butanol-acetona- $H_2O$  (4:5:1); el tiempo de elución es de 24 y 72 horas. Se revelan con nitrato de plata amoniacal NaOH (Hough y Jones, 1962).

6.- Espectros infrarrojos. - Se obtienen por la técnica del bromuro potásico en un espectrofotómetro infrarrojo Perkin-Elmer 457. La presencia de sustituyentes en polisacáridos, tales como grupos acetamido, carboxilo, y sulfato, puede ser reconocida a partir de sus bandas de absorción características en el espectro infrarrojo. En muchos casos también puede ser determinada la configuración de los enlaces interglicosídicos existentes en un polisacárido, por análisis del espectro infrarrojo (Brimacombe y Webber, 1964).

## VII.- MICROSCOPIA ELECTRONICA

1.- Fijación. - Se ha seguido el método de Kellenberger y col. (1958).

Soluciones para fijación:

a) Solución tampón acetato-veronal de Michaelis:

Acetato sódico hidratado ( $3H_2O$ )	1.94	g
Veronal sódico	2.94	g
NaCl	3.4	g
$H_2O$ destilada hasta	100	ml

## b) Solución tampón de Kellenberger

Solución tampón veronal-acetato	5 ml
HCl 0,1N	7 ml
H <sub>2</sub> O destilada	13 ml
CaCl <sub>2</sub> 1M	0,25 ml

El pH se ajusta a 6,1 con HCl. Esta solución tampón se prepara el mismo día que se va a utilizar ya que se contamina con mucha facilidad. Se emplea para preparar el fijador y el líquido de lavado.

## c) Fijador de Kellenberger

Se disuelve 0,1 g de OsO<sub>4</sub> en 100 ml de la solución tampón de Kellenberger. El pH no cambia.

## d) Líquido de lavado

Se disuelve 0,5 g de acetato de uranilo en 100 ml de la solución tampón de Kellenberger. El pH baja a 5. Este líquido se mantiene varias semanas a 4°C.

## e) Medio triptona

Se disuelven 9g de Bacto-triptona (Difco) y 0,5 g de NaCl en 100 ml de agua destilada.

## Procedimiento:

Los esclerocios se cortan en pequeños fragmentos de aproximadamente 1 mm<sup>3</sup>, se ponen en tubos pequeños de vidrio y se tratan con el fijador de Kellenberger diluido a 1/10 en el tampón de Kellenberger, o con una solución al 2% de glutaraldehído en dicho tampón. Este tratamiento (prefijación), se realiza a 4°C durante dos horas. Pasado este tiempo se elimina el líquido por decantación y se lava el mate-

rial varias veces con el tampón. Para fijar el material se añade a los tubos, conteniendo el material prefijado, 1 ml de fijador de Kellenberger más 0,1 ml del medio de triptona dejándolos durante la noche a 4°C. Terminada la fijación se lavan los fragmentos para eliminar el fijador.

## 2.- Deshidratación para la inclusión en Araldita.-

El material una vez fijado se deshidrata según el siguiente esquema:

1	Alcohol o acetona	30%	15 minutos
2	"	" 50%	30 "
3	"	" 70%	30 "
3'	"	" 70% + contraste *	12 ó más horas
4	"	" 90%	30 minutos
5	"	" 100%	30 "
6	Alcohol + CuSO <sub>4</sub>		30 "
7	" + "		30 "

\* Contraste: Consiste en una solución de acetato de uranilo  $((H_3C-COO)_2UO_2 \cdot 2H_2O)$  al 2% en acetona de 70%. Conviene hacer una segunda tinción sobre los cortes.

3.- Inclusión.- Los esclerocios deshidratados se incluyen en Araldita (CIBA, Basilea, Suiza), según el siguiente esquema:

Oxido de propileno	+	Araldita I	(3:1)	2 horas
Oxido de Propileno	+	Araldita I	(2:2)	2 horas
Oxido de Propileno	+	Araldita I	(1:3)	2 horas

Araldita	I	a 50°C	2 horas
Araldita	I	a 50°C	1 noche
Araldita	II	a 50°C	1 hora
Araldita	II	a 50°C	30 minutos

Los bloques se colocan finalmente en cápsulas de gelatina rellenas con Araldita II. La polimerización se hace a 60°C durante 12 a 48 horas. El material se secciona en un microtomo.

4.- Tinción.- Para hacer la tinción se sigue el método de Reynolds (1963).

Solución de Reynolds:

El citrato de plomo se prepara mezclando 1,33 g de nitrato de plomo, 1,76 g de citrato sódico y 30 ml de agua destilada en un matraz volumétrico de 50 ml. La suspensión resultante se agita fuertemente durante un minuto y se deja en reposo, agitando de vez en cuando para facilitar la conversión total del nitrato de plomo en citrato de plomo. Después de 30 minutos se añade 8 ml de NaOH 1N, la suspensión se diluye hasta 50 ml con agua destilada y se mezcla bien. La solución queda a pH 12. En caso de que hubiera turbidez se centrifuga.

Esta solución si se guarda en botellas de cristal o polietileno, puede durar seis meses. Es aconsejable centrifugar antes de usar cuando la solución lleva cierto tiempo preparada.

Procedimiento:

Las rejillas con los cortes se tiñen suspendiéndolas sobre gotas de la solución de Reynolds. Un buen procedimien-

to es colocarlas sobre una placa Petri cuyo fondo ha sido recubierto por una cera, de esta manera se pueden teñir treinta o cuarenta rejillas de una vez. El tiempo de tinción y las concentraciones de la solución dependen del procedimiento utilizado en la fijación e inclusión, generalmente cuando se usa Araldita el tiempo es de 15 a 30 minutos. Después de la tinción, las rejillas se lavan con un chorro de NaOH 0,02N y de agua destilada utilizando frascos lavadores de plástico, a continuación se las deja secar.

Los cortes se examinaron en un microscopio electrónico Philips EM-300 ó en un Jeol JEM-100B.

#### APARATOS UTILIZADOS

- Incubador orbital Gallenkamp IH-465
- pH-metro Crison mod. digit. 74
- Espectrofotómetro visible-ultravioleta Perkin-Elmer 55B
- Espectrofotómetro infrarrojo Perkin-Elmer 457
- Centrífuga Sorvall SS-3, rotor GSA
- Balanza analítica Mettler H-35 AR
- Estufa Selecta mod. 200
- Omni-Mixer Ivan Sorvall Inc., Norwalk, Connecticut, U.S.A.
- Rotavapor Buchi R.
- Incubador estático Mazzli IONOS 102
- Aparato de Soxhlet
- Cromatógrafo de gases Perkin-Elmer F-11
- Microtomo Reichert Austria MU2
- Microscopio electrónico Philips EM-300
- Microscopio electrónico Jeol JEM-100B

#### PRODUCTOS

Los productos utilizados en este trabajo proceden de las casas Merck y Riedel-de Haen AG, Seelze-Hannover

## RESULTADOS

### I. COMPOSICION QUIMICA Y ESTRUCTURAL DEL POLISACARIDO EXTRACELULAR DE BOTRYTIS CINEREA

#### 1.- Polisacárido extracelular

El polisacárido utilizado para los estudios de composición y estructura se prepara precipitando los caldos metabólicos procedentes de cultivos del microorganismo de 7 días, en las condiciones descritas en materiales y métodos. La producción del polisacárido es aproximadamente de 1 g/l. Recién precipitado, antes de recogerlo, tiene aspecto mucoso transparente, cuando se remueve con la espátula se adhiere a ésta separándose así del líquido. El precipitado se lava con alcohol del 50% varias veces para eliminar restos de azúcares y sales del medio de cultivo. Durante este proceso toma un tono grisáceo. Después de desecado a 80°C hasta peso constante se pulveriza. En este producto se han realizado los estudios de composición y estructura.

#### 2.- Análisis químico

La composición química del polisacárido extracelular de B. cinerea se muestra en la Tabla I.

Para la determinación de carbohidratos totales se ha seguido el método de la antrona (Loewus, 1952). Los azúcares se han identificado como glucosa (92-95%) por cromatografía en papel, una vez hidrolizado el polisacárido con HCl 3N durante 2 horas a 100°C (condiciones en las que se ob-

tuvo el máximo poder reductor del hidrolizado). Para el revelado se ha utilizado ftalato de anilina (Dawson y col., 1962) y nitrato de plata (Hough y Jones, 1962), indistintamente.

La determinación de proteína total (4-5%) se ha llevado a cabo según el método de Lowry y col. (1951) añadiendo a 10 mg de polisacárido 1 ml de NaOH 1N y dejándolo actuar durante toda la noche a temperatura ambiente para extraer totalmente la proteína. De esta solución se tomaron partes alícuotas para hacer la determinación.

El ion fosfato se ha determinado por el método de Lowry y López (1946) en el polisacárido hidrolizado con HCl 2N, 4N y 6N durante 2 horas a 100°C. El polisacárido de Botrytis cinerea no contiene ion fosfato.

Los aminoazúcares se han determinado por el método de Rondle y Morgan (1955) en el polisacárido hidrolizado con HCl 2N, 4N y 6N durante 2 horas a 100°C. Por cromatografía en papel se ha identificado la galactosamina (3-4%) como único aminoazúcar. Para el revelado se ha utilizado p-dimetilbenzaldehído. (Dawson y col., 1962).

Para la determinación de ácidos urónicos se sigue el método de Dische (1947). El polisacárido en estudio no contiene ácidos urónicos.



TABLA I. Composición (%) del polisacárido extracelular de B. cinerea.

Carbohidratos totales	92-95
Galactosamina	3-4
Proteína	4-5
Ion fosfato	negativo
Ac. urónicos	negativo

### 3.- Análisis estructural

a) Oxidación con periodato sódico del polisacárido.  
Valoración del ácido fórmico en la mezcla de oxidación.  
Degradación de Smith. Identificación de los productos  
resultantes por cromatografía en papel.

Una suspensión del polisacárido (2 mg/ml) se trata con 1 volumen de periodato sódico hasta que las lecturas de la densidad óptica se mantienen constantes, en este caso a las 144 horas. El consumo de periodato es de 0,57 moles (Tabla II) con formación de 0,23 moles de ácido fórmico por mol de residuo de glucosa.

TABLA II. Periodato consumido/ $\mu$ moles de residuo de hexosa durante la oxidación con periodato sódico del polisacárido extracelular de B. cinerea.

T° Incubación (días)	Glucosa	Polisacárido
1	4,33	0,38
2	4,50	0,42
5	5,07	0,46
6	5,00	0,57
7	5,00	0,57

Conociendo los moles de periodato consumidos y el ácido fórmico producido se puede calcular el porcentaje de enlaces  $1 \rightarrow 6$ ,  $1 \rightarrow 4$  y  $1 \rightarrow 3$  del polisacárido según el siguiente esquema (Jeanes, 1965):

$$\begin{aligned} \text{Enlaces } (\%) \quad 1 \rightarrow 6 &= n^{\circ} \text{ moles ácido fórmico} \times 100 \\ " \quad " \quad 1 \rightarrow 4 &= n^{\circ} \text{ moles periodato} \times 100 - (2 \times n^{\circ} \\ &\quad \text{de moles ácido fórmico} \times 100) \\ " \quad " \quad 1 \rightarrow 3 &= 100 - \% \text{ enlaces } (1 \rightarrow 4 + 1 \rightarrow 6) \end{aligned}$$

En la Tabla III se indica el porcentaje de los distintos enlaces hallados en el polisacárido extracelular de B. cinerea.

TABLA III Porcentaje de enlaces en el polisacárido extracelular de B. cinerea.

Tipo de enlace	(%)
$1 \rightarrow 6$	23
$1 \rightarrow 4$	11
$1 \rightarrow 3$	66

Los productos resultantes de la degradación de Smith del polisacárido oxidado con periodato, se han identificado por cromatografía en papel como glucosa, galactosamina y trazas de glicerina utilizando para el revelado nitrato de plata amoniacal (Hough y Jones, 1962).

b) Espectroscopía infrarroja del polisacárido.

En el espectro infrarrojo (Fig. 6) del polisacárido extracelular de B. cinerea las bandas de absorción a  $890\text{ cm}^{-1}$  indican la presencia de enlaces glicosídicos con configuración  $\beta$  entre los residuos de hexosa (Barker y col., 1956). La ausencia de bandas de absorción a  $1560$  y  $1650\text{ cm}^{-1}$  características de los grupos  $-\text{CO}-\text{NH}$  de proteínas y de los grupos N-acetilo de la quitina confirma que estas sustancias no existen o se encuentran en concentración muy baja.

## II.- FISILOGIA DE LA PRODUCCION DEL POLISACARIDO EXTRACELULAR

### 1.- Efecto de la fuente de carbono

Los experimentos se han realizado en matraces Erlenmeyer de 250 ml conteniendo 25 ml de medio de cultivo. Los cultivos se inoculan con 1 gota de suspensión de esporas y se incuban estáticamente a  $25^{\circ}\text{C}$ .

a) Efecto de la concentración de glucosa. Para estudiar el efecto de la concentración de glucosa en la producción de polisacárido se ha utilizado el medio base con L-asparagina (4 g/l) como fuente de nitrógeno. Las concentraciones de glucosa ensayadas han sido 5, 10, 15, 20, 25 y 30 g/l respectivamente. La producción de polisacárido aumenta cuando aumenta la concentración de glucosa hasta 20 g/l. Con 25 y 30 g/l la producción de polisacárido es igual a la obtenida con 20 g/l. La figura 7 muestra el polisacárido producido con las distintas concentraciones de glucosa a los 5, 10 y 15 días de cultivo.

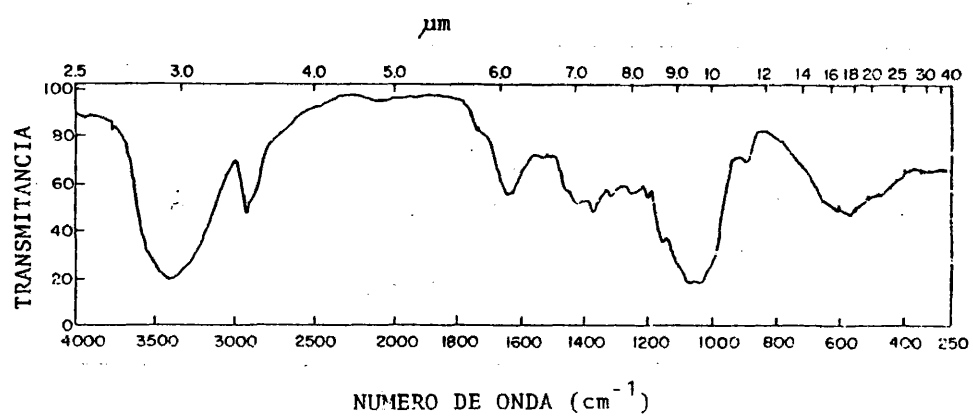


Fig. 6 Espectro infrarrojo del polisacárido extracelular de B. cinerea.

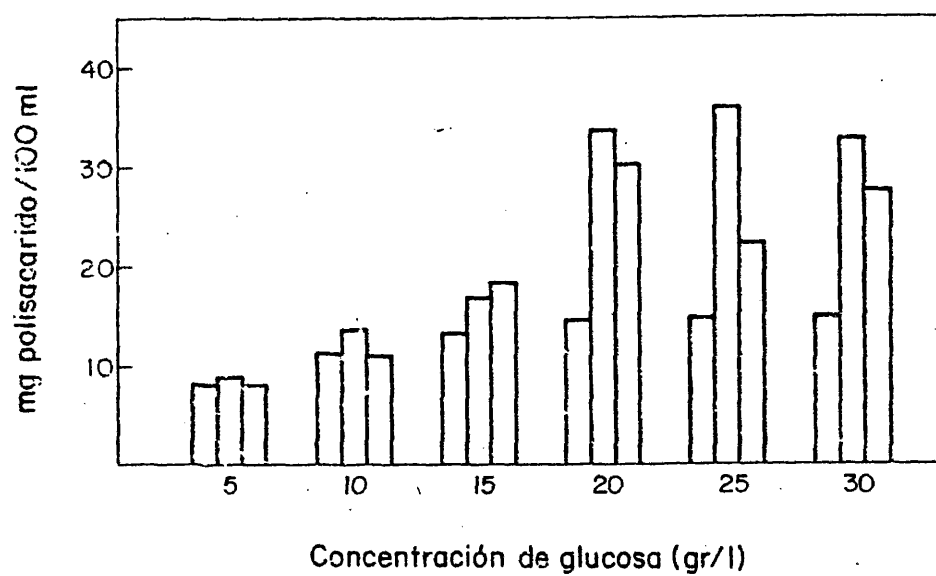


Fig. 7. Producción de polisacárido con diferentes concentraciones de glucosa a los 5, 10 y 15 días de incubación.

b) Efecto de las distintas fuentes de carbono. Para investigar el efecto de los diferentes azúcares en la producción de polisacárido, la glucosa se ha reemplazado en el medio base por 20 g/l de distintos azúcares: L-arabinosa, D-fructosa, D-galactosa, D-manosa, maltosa y lactosa. Como fuente de nitrógeno se han empleado extracto de levadura (4 g/l). Los cultivos se han recogido a los 10 y 15 días después de inoculados. Se ha producido polisacárido en todos los azúcares ensayados, la cantidad producida ha sido ligeramente mayor cuando se ha empleado glucosa o lactosa (Fig. 8).

## 2.- Efecto de la fuente de nitrógeno

### a) Efecto de la concentración de la fuente de nitrógeno.

El estudio del efecto de la concentración de la fuente de nitrógeno en la producción de polisacárido se realiza sustituyendo la fuente de nitrógeno del medio base por diferentes concentraciones de L-asparagina. Las concentraciones de asparagina utilizadas han sido 0,5, 1, 2, 4 y 6 g/l y las muestras se han tomado a los 5, 11 y 15 días de incubación. La producción de polisacárido decrece a medida que aumenta la concentración de asparagina (Fig. 9). El crecimiento del hongo, la formación de polisacárido y la utilización de la glucosa, se muestran en la Tabla IV. El crecimiento, formación de polisacárido y cambios en el pH y en la concentración de glucosa de un medio de cultivo que contiene 4 g/l de asparagina se muestran en la Fig. 10. La máxima producción de micelio (740 mg/100 ml) se consigue a los 9 días de crecimiento y la máxima producción de polisacárido (22 mg/100 ml) a los 11 días. La glucosa residual desaparece del medio a los 11 días y el pH desciende de 6,5 a 4 a los 4 días de

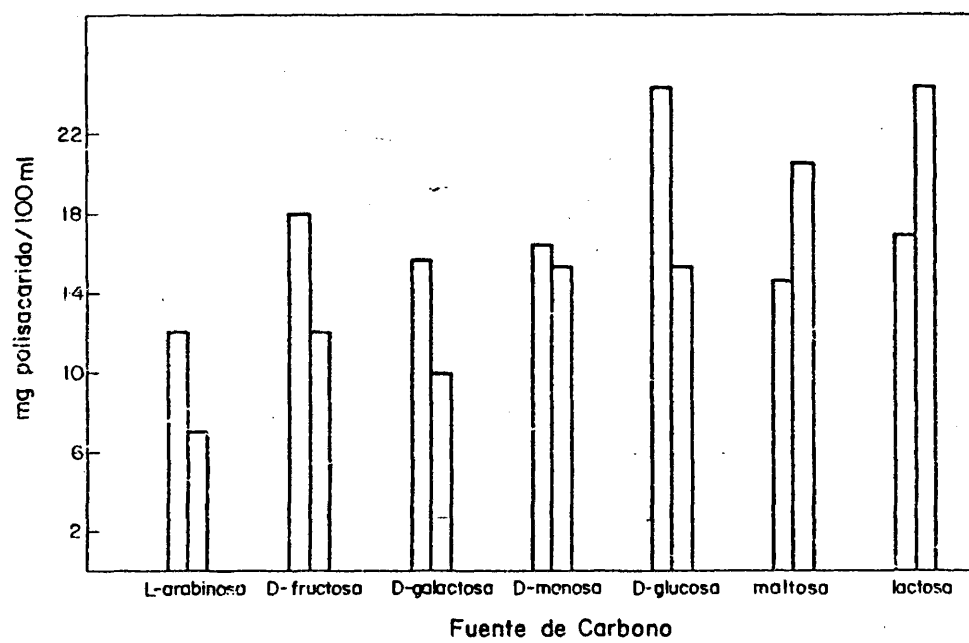


Fig. 8. Producción de polisacárido con distintas fuentes de carbono a los 10 y 15 días de incubación.



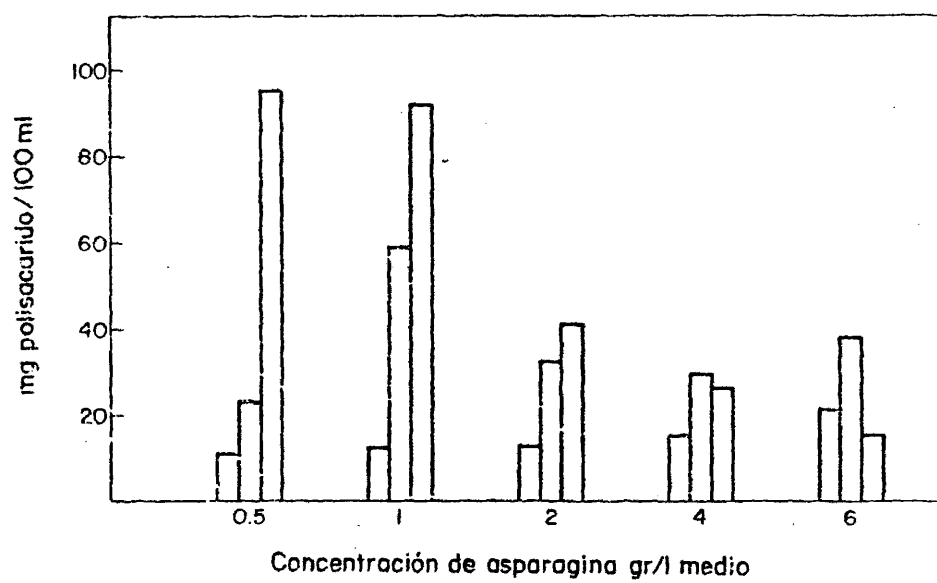


Fig. 9. Producción de polisacárido con diferentes concentraciones de asparagina a los 5, 11 y 15 días de incubación.

TABLA IV. Producción de polisacárido con diferentes concentraciones de asparagina

		Concentración asparagina (g/l)				
		0,5	1,0	2,0	4,0	6,0
5 días incubación						
pH		3,38	3,38	3,70	3,89	3,87
glucosa residual (mg/ml)		17,5	14,7	13,3	11,1	9,2
polisacárido extracelular (mg/100 ml)		11,5	12,6	13,2	15,5	21,6
micelio (mg/100 ml)		278,0	434,4	470,0	529,0	548,6
10 días incubación						
pH		3,15	3,78	4,75	5,28	5,25
glucosa residual (mg/ml)		2,4	1,6	0,3	0,5	0,2
polisacárido extracelular (mg/100 ml)		23,5	59,4	33,3	30,5	38,9
micelio (mg/100 ml)		591,0	931,0	786,0	946,0	872,0
15 días incubación						
pH		3,15	4,13	6,10	6,33	6,35
glucosa residual (mg/ml)		0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
polisacárido extracelular (mg/100 ml)		95,8	92,3	41,8	27,0	15,9
micelio (mg/100 ml)		689,2	906,0	413,2	513,0	384,4

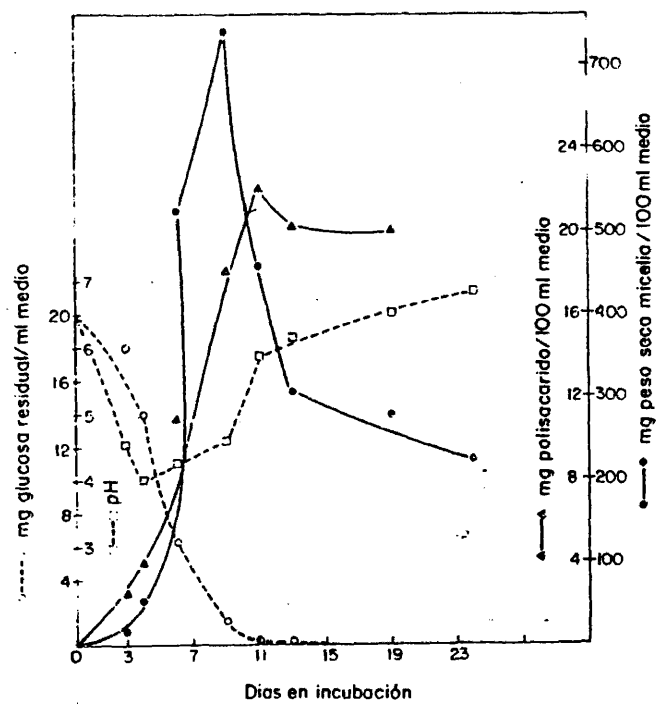


Fig.10. Crecimiento, cambios en el pH del medio, glucosa residual y producción de polisacárido cuando *B. cinerea* crece en un medio que contiene 4 g/l de asparagina.

incubación para volver a ascender a 6,8 a los 23 días. La formación de polisacárido cesa cuando la glucosa desaparece del medio de cultivo, pero no se degrada en días sucesivos, al contrario de lo que ocurre con el micelio que pierde el 75% de su peso.

También se ha estudiado la concentración de la fuente de nitrógeno utilizando tartrato diamónico en lugar de asparagina. Las concentraciones empleadas han sido 0,61, 1,22, 2,45, 4,9 y 7,35 g/l (4 g de asparagina aportan al medio el mismo N que 4,9 g de tartrato diamónico). En este caso, lo mismo que cuando se utiliza asparagina la producción de polisacárido decrece al aumentar la concentración de tartrato diamónico. Las muestras han sido tomadas a los 5, 10 y 15 días de incubación. (Fig. 11). El crecimiento del hongo, la formación de polisacárido y la utilización de la glucosa se muestran en la Tabla V.

Cuando se utiliza como fuente de nitrógeno  $\text{KNO}_3$  en la proporción de 5,39 g/l (equivalente en N a 4 g/l de asparagina) la mayor cantidad de micelio (572 mg/100 ml) corresponde al 9º día de incubación, y la mayor producción de polisacárido (24 mg/100 ml) al día 12. La glucosa residual desaparece del medio a los 15 días de empezado el experimento y el pH cambia de 4,32 a los 5 días de incubación a 6,07 a los 22 días (Fig. 12).

Cuando el  $\text{NO}_3\text{K}$  se usa en la proporción de 0,67 g/l equivalente a 0,5 g/l de asparagina la máxima producción de micelio (704 mg/100 ml) corresponde a los 18 días y la máxima producción de polisacárido (318 mg/100 ml) se obtiene a los 20 días. La glucosa residual desaparece a los 13 días de

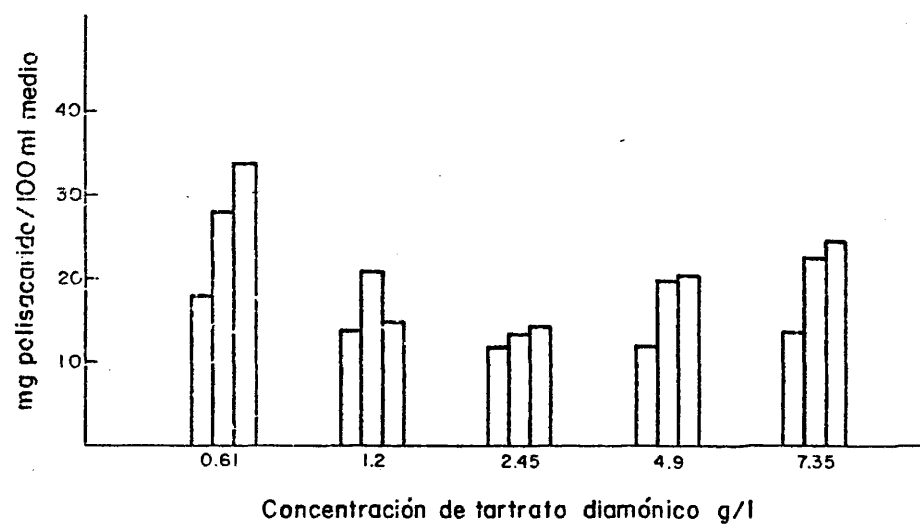


Fig. 11. Producción de polisacárido con diferentes concentraciones de tartrato diamónico a los 5, 10 y 15 días de incubación.

TABLA V. Producción de polisacárido con diferentes concentraciones de tartrato diamónico

		Concentración de tartrato diamónico (g/l)					
		0,61	1,22	2,45	4,90	7,35	
5 días incubación							
pH		3,12	2,92	3,24	3,75	3,87	
glucosa residual (mg/ml)		16,92	14,10	12,00	10,77	9,50	
polisacárido extracelular (mg/100 ml)		17,81	13,90	12,43	12,45	13,82	
micelio (mg/100 ml)		170,00	546,00	538,00	443,00	547,00	
10 días incubación							
pH		3,23	2,75	4,97	5,48	5,70	
glucosa residual (mg/ml)		2,34	2,20	0,49	9,76	0,54	
polisacárido extracelular (mg/100 ml)		28,00	21,50	13,40	20,00	22,50	
micelio (mg/100 ml)		628,00	680,00	818,00	740,00	704,00	
15 días incubación							
pH		3,16	3,95	6,06	6,25	6,41	
glucosa residual (mg/ml)		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
polisacárido extracelular (mg/100 ml)		34,16	15,22	14,70	20,33	24,52	
micelio (mg/100 ml)		674,00	677,00	262,00	343,00	345,00	

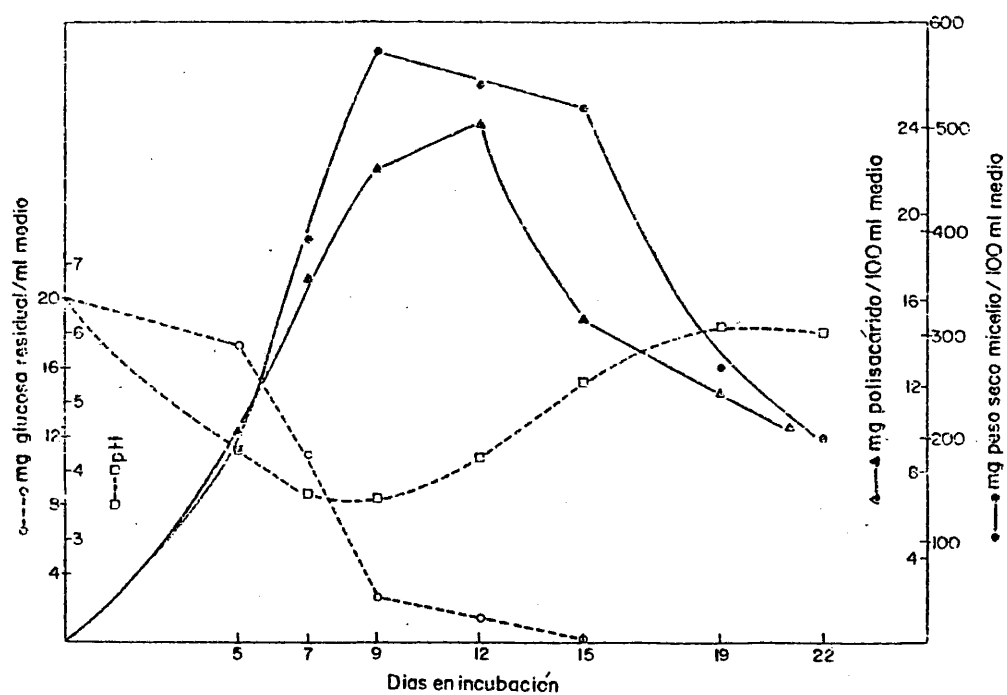


Fig. 12. Crecimiento, cambios en el pH del medio, glucosa residual y producción de polisacárido cuando *B. cinerea* crece en un medio que contiene 5,39 g/l de  $\text{KNO}_3$ .

incubación, y el pH al final del experimento es de 3,22 (Fig. 13).

b) Utilización de las fuentes de nitrógeno. - Una vez que se ha comprobado que la concentración óptima de asparagina para la producción de polisacárido extracelular es de 0,5 g/l, se estudian distintas fuentes de nitrógeno sustituyendo en el medio base que contiene 20 g/l de glucosa, los 0,5 g de asparagina por distintos aminoácidos, en una concentración tal que el nitrógeno sea equivalente al correspondiente a 0,5 g de asparagina. Todos los medios tienen un pH inicial de 6,5.

Con L-leucina (0,87 g/l) como fuente de nitrógeno la mayor cantidad de micelio (520 mg/100 ml) y de polisacárido (133 mg/100 ml) se obtienen a los 17 días de incubación. La glucosa residual desaparece del caldo de cultivo a los 25 días y el pH se mantiene casi constante a partir del 4º día de incubación (Fig. 14).

Cuando se utiliza L-alanina (0,59 g/l) la mayor cantidad de micelio (524 mg/100 ml) se recoge a los 19 días de incubación y la mayor cantidad de polisacárido (190 mg/100 ml) a los 27 días. La glucosa residual desaparece del caldo de cultivo a los 27 días y el pH prácticamente no varía desde la 1ª recogida (5 días de incubación) hasta el último día del experimento. (Fig. 15).

Cuando se emplea L-valina (0,78 g/l) como fuente de nitrógeno, la mayor cantidad de micelio (550 mg/100 ml) y de polisacárido (240 mg/100 ml) corresponden a los 20 días de incubación. La glucosa residual desaparece del caldo de cultivo a los 13 días y el pH desciende hasta 3 durante el



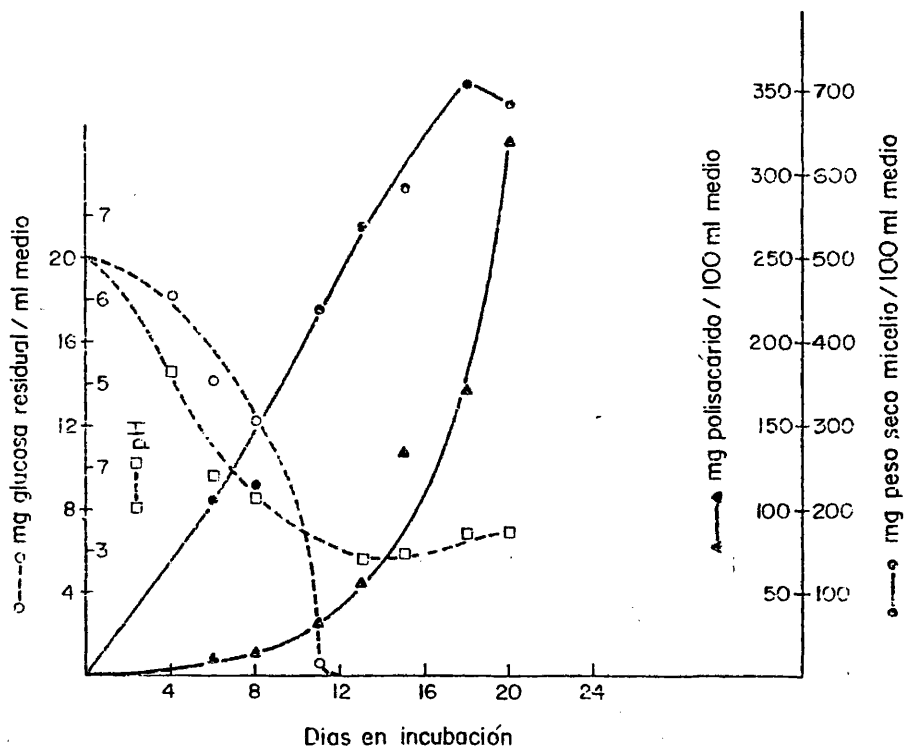


Fig. 13. Crecimiento, cambios en el pH del medio, glucosa residual y producción de polisacárido cuando *B. cinerea* crece en un medio que contiene 0,67 g/l de  $\text{KNO}_3$

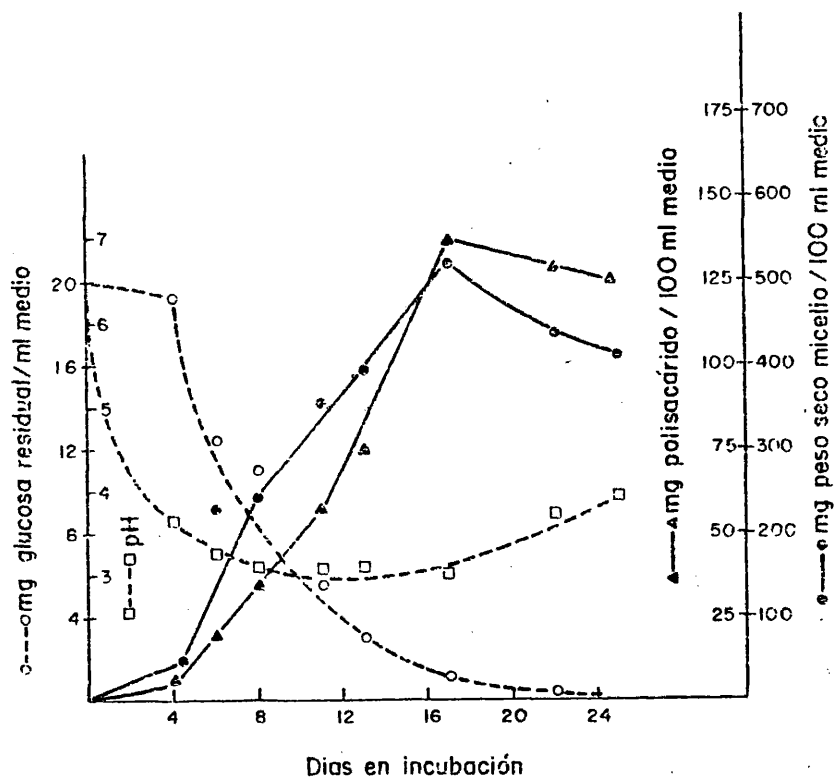


Fig. 14. Crecimiento, cambios en el pH del medio, glucosa residual y producción de polisacárido cuando *B. cinerea* crece en un medio que contiene 0,87 g/l de leucina.

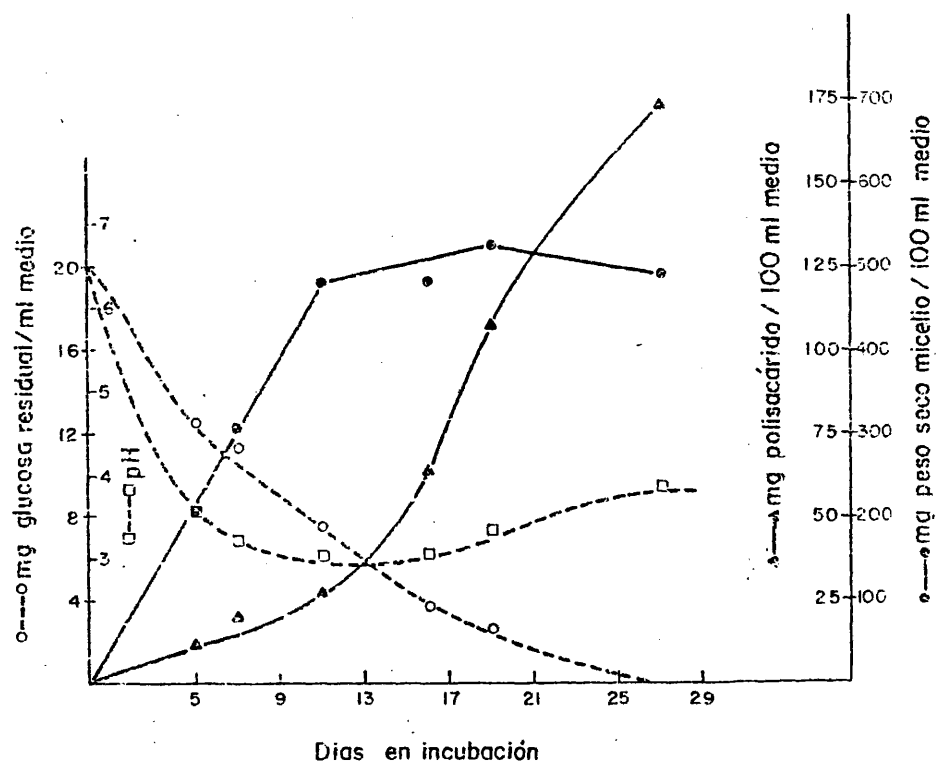


Fig. 15. Crecimiento, cambios en el pH del medio, glucosa residual y producción de polisacárido cuando *B. cinerea* crece en un medio que contiene 0,59 g/l de albúmina.

experimento (Fig. 16).

Cuando la fuente de nitrógeno utilizada es  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (0,44 g/l) a los 22 días de incubación se obtiene la mayor cantidad de micelio (464 mg/100 ml), y la mayor producción de polisacárido (246 mg/100 ml) corresponde a los 20 días. La glucosa residual desaparece del medio a los 15 días, y el pH varía de 3,91 a los 4 días de incubación a 2,45 al final del experimento (Fig. 17).

Con ácido L-aspartico (7,1 g/l) equivalente a 4 g/l de asparagina, como fuente de nitrógeno, la mayor cantidad de micelio (657 mg/100 ml) corresponde a los días 7º y 9º de incubación y la mayor producción de polisacárido (31,16 mg/100 ml) al día 17. La glucosa residual desaparece del medio a los 14 días y el pH oscila de 2,97 el primer día de incubación a 6,86 a los 26 días (Fig. 18). A partir del 8º día de incubación parte del polisacárido tuvo que ser recogido por centrifugación.

En la Tabla VI se resumen los gráficos anteriores. Las cifras de pH, días en incubación y cantidad de micelio corresponden al día de mayor producción de polisacárido con cada una de las fuentes de nitrógeno probadas. También se han tenido en cuenta las distintas concentraciones ensayadas para una misma fuente de nitrógeno.

3.- Efecto de la tiamina.- El efecto de la tiamina se ha estudiado en el medio basal en el que la concentración de la fuente de nitrógeno es de 1 g/l de asparagina. Se prepararon dos lotes de matraces, uno con tiamina y otro sin ella. Los resultados fueron similares en ambos casos (Tabla VII).

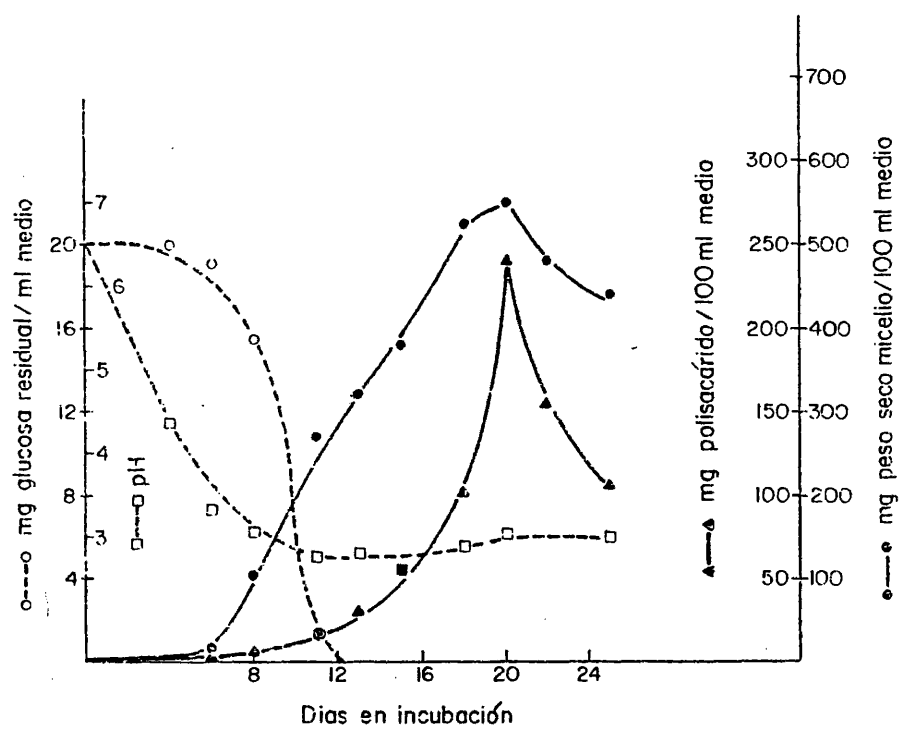


Fig. 16. Crecimiento, cambios en el pH del medio, glucosa residual y producción de polisacárido cuando *B. cinerea* crece en un medio que contiene 0,78 g/l de valina.

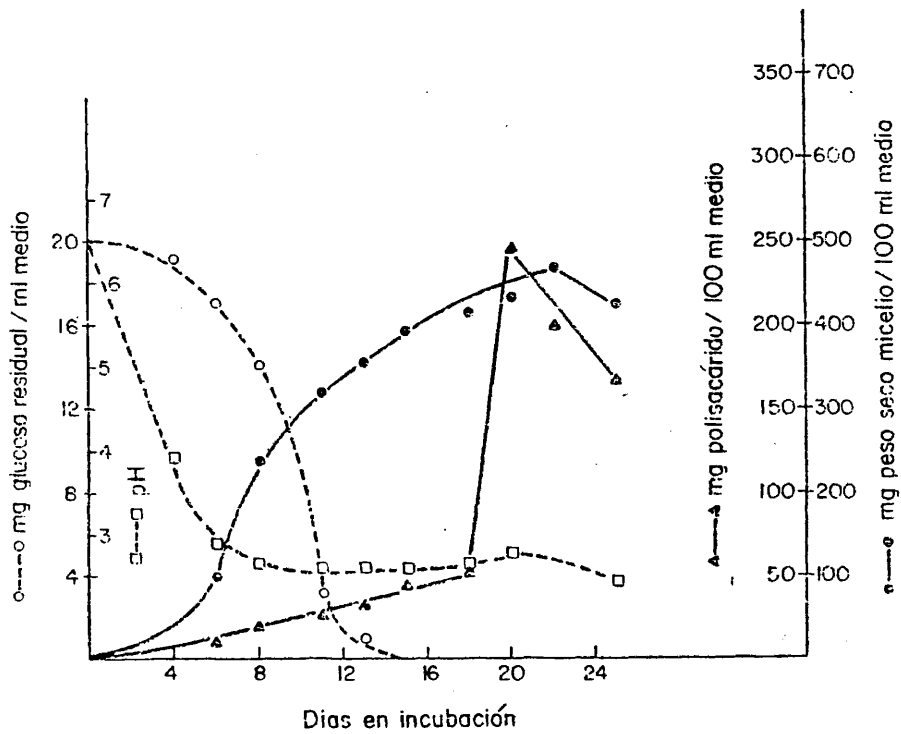


Fig. 17. Crecimiento, cambios en el pH del medio, glucosa residual y producción de polisacárido cuando *B. cinerea* crece en un medio que contiene 0,44 g/l de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ .

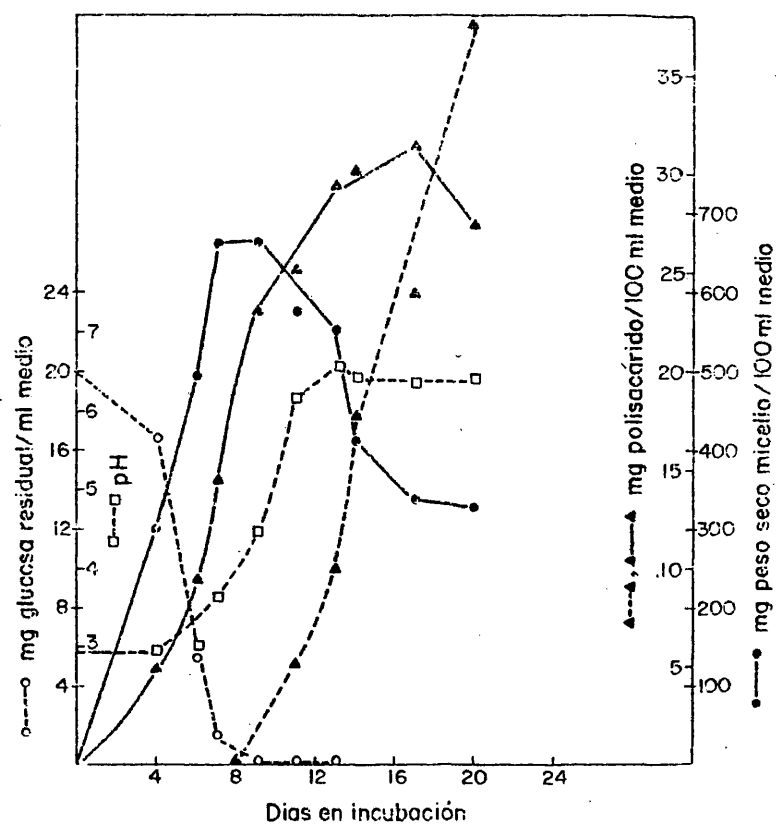


Fig.18. Crecimiento, cambios en el pH del medio, glucosa residual y producción de polisacárido cuando *B. cinerea* crece en un medio que contiene 7,1 g/l de ac. aspártico.

TABLA VI. Efecto de la fuente de nitrógeno en la producción de polisacárido

Fuente de nitrógeno (g/l)	pH	Polisacárido (mg/100 ml)	Días en incubación	Micelio (mg/100 ml)
Asparagina (0,5)	3,15	95,8	15	689
Asparagina (1)	4,13	92,3	15	906
Asparagina (2)	6,10	41,8	15	413
Asparagina (4)	6,33	30,5	10	513
Asparagina (6)	5,25	39,0	10	872
NO <sub>3</sub> -K (0,67)	3,22	318,0	20	677
NO <sub>3</sub> -K (5,39)	4,22	24,0	12	545
Tartrato diamónico (0,61)	3,16	34,2	15	674
Tartrato diamónico (1,22)	2,75	21,5	10	680
Tartrato diamónico (2,45)	6,06	14,7	15	262
Tartrato diamónico (4,90)	6,25	20,3	15	343
Tartrato diamónico (7,35)	6,41	24,5	15	345
L-leucina (0,87)	3,12	133,0	17	520
L-alanina (0,59)	3,80	190,0	27	484
L-valina (0,78)	3,06	240,0	20	550
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (0,44)	2,56	246,0	20	427
ácido L-aspártico (7,1)	6,35	31,2	17	340

El pH inicial es de 6,5 para todas las fuentes de nitrógeno excepto para el ac. L-aspártico que es de 2,97.



TABLA VII. Efecto de la tiamina en la producción de polisacárido

Días en incubación	Tiamina	pH	Micelio (mg/100 ml)	Polisacárido (mg/100 ml)
5	-	3,65	146	6,77
	+	3,61	96	7,94
10	-	4,41	652	12,64
	+	4,32	658	15,45
15	-	5,71	492	20,00
	+	5,62	519	19,21

- sin tiamina

+ con tiamina

4.- Efecto de la relación superficie/volumen en cultivos estáticos.- Se incubaron estáticamente matraces de 250 ml con 25, 50 y 100 ml de medio respectivamente en medio base con 1 g/l de asparagina como fuente de nitrógeno. En la Tabla VIII puede verse el pH y producción de micelio y polisacárido en cada uno de los medios.

TABLA VIII. Efecto de la relación superficie/volumen en cultivos estáticos.

Días en incubación	Volumen	pH	Micelio (mg/100 ml)	Polisacárido (mg/100 ml)
5	25	3,61	96	7,94
5	50	4,60	45	4,78
5	100	4,50	33	3,55
10	25	4,34	658	15,45
10	50	3,18	403	8,13
10	100	4,47	378	6,81
15	25	5,62	519	19,20
15	50	4,33	552	17,46
15	100	3,95	818	11,90

### III.- COMPOSICION QUIMICA DE LOS ESCLEROCIOS

#### 1.- Influencia de la luz en la formación de esclerocios.-

Se inoculan dos lotes de placas Petri de 10,5 cm de diámetro con unas gotas de una suspensión de conidios. Un lote se incuba en oscuridad y el otro junto a una ventana por la que no entre luz directa del sol. Se observa que se forman más esclerocios en las placas incubadas en oscuridad (Fig. 19).

#### 2.- Influencia de la temperatura en la formación de esclerocios.-

El medio de cultivo se reparte en porciones de 100 ml en frascos Roux de 1 litro de capacidad y se inoculan con 1 ml de una suspensión de conidios. Se incuban en oscuridad a 18 y 25°C respectivamente. Al cabo de 15 días de incubación se ve que en las placas inoculadas a 18°C los esclerocios son menos y más grandes de tamaño que en las placas inoculadas a 25°C.

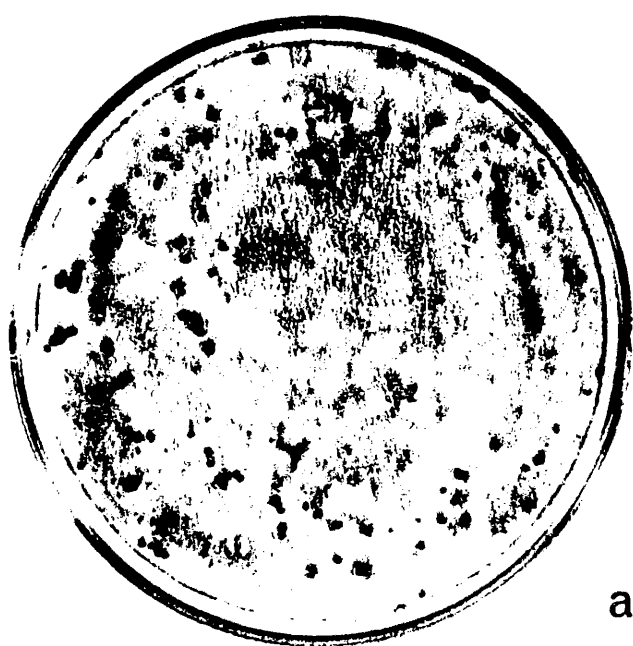
#### 3.- Efecto de la fuente de carbono.-

Los experimentos se han realizado en placas Petri de 10,5 cm de diámetro conteniendo 40 ml de medio por placa. Los cultivos se han inoculado con una gota de una suspensión de esporas que se extiende sobre la superficie del agar.

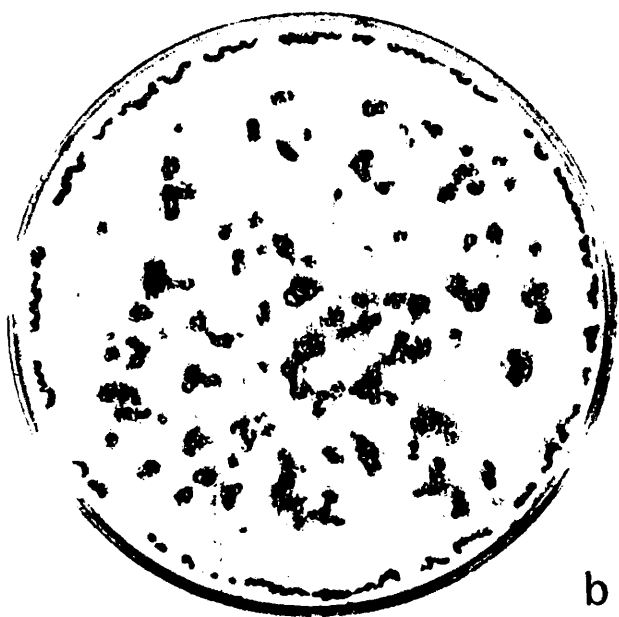
##### a) Efecto de la concentración de glucosa en la producción de esclerocios en un medio conteniendo extracto de judías.-

Para estudiar el efecto de la concentración de glucosa en la producción de esclerocios a un medio conteniendo extractos de judías verdes se le añaden distintas concentraciones de glucosa de modo que la concentración final de la misma sea 0, 1 y 2% respectivamente. Se incuban a 18°C en oscuridad, y los esclerocios se recogen a los 16 días de incubación. La

Fig. 19. Influencia de la luz en la formación de esclerocios: a) placa expuesta a la luz diurna, b) placa incubada en oscuridad.



a



b

Fig.19

1167

adición del 1% de glucosa al medio base incrementa aproximadamente en 8 veces el número de esclerocios formados (Fig. 20). El peso seco de los esclerocios en el medio base es de (63 mg/placa) mientras que en el medio con glucosa es de (465 mg/placa). No se observan diferencias entre las placas que contienen 1 ó 2% de glucosa.

b) Efecto de la concentración de glucosa en la formación de esclerocios en un medio sintético.- Para estudiar el efecto de la concentración de glucosa en la producción de esclerocios se ha utilizado el medio base con L-asparagina (1 g/l) como fuente de nitrógeno. Las concentraciones de glucosa ensayadas han sido 5, 10, 20 y 40 g/l. Se incubó a temperatura ambiente, y los esclerocios se recogen a los 20 días. El mayor número de esclerocios y el mayor peso seco (585 mg/placa) se ha obtenido en el medio con 20 g/l de glucosa (Tabla IX).

#### 4.- Análisis químico

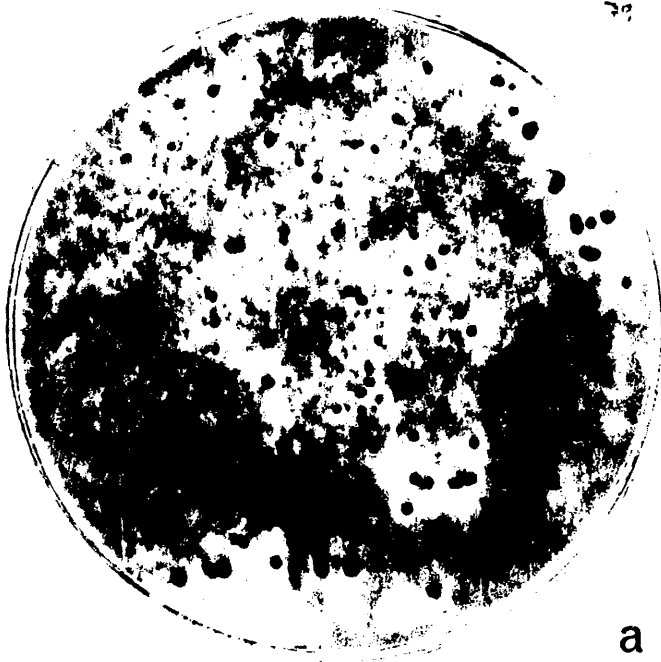
La composición química (%) de los esclerocios formados en el medio base más 1% de glucosa se muestra en la Tabla X.

Para la determinación de carbohidratos totales se ha seguido el método de la antrona (Loewus, 1952). Se ha identificado la glucosa (75%), como único azúcar, por cromatografía en papel, una vez hidrolizados los esclerocios.

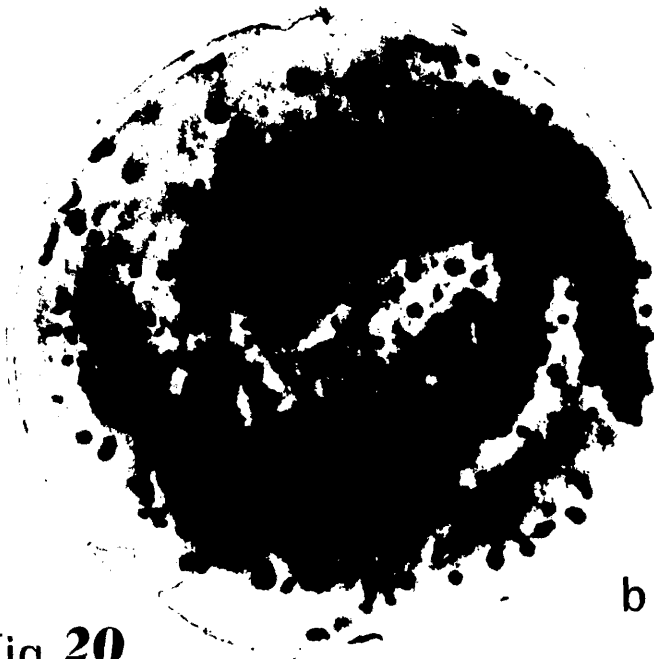
La proteína total (10%) se ha determinado por el método de Lowry y col. (1951) después de tratar 10 mg de esclerocios pulverizados con 1 ml de NaOH durante toda la noche.



Fig. 20. Efecto de la concentración de glucosa en la producción de esclerocios: a) placa a la que no se ha añadido glucosa, b) placa a la que se ha añadido 1% de glucosa.



a



b

Fig. 20

TABLA IX . Efecto de la concentración de glucosa en la formación de esclerocios en medio sintético.

Conc. de glucosa (g/l)	Nº de esclerocios/ placa	Peso seco (mg/placa)
5	13	11,0
10	69	123,3
20	312	585,0
40	263	447,0

TABLA X . Composición química (%) de los esclerocios

Carbohidratos totales	75
Proteína	10
Glucosamina	5
Lípidos libres	0,08
Lípidos ligados	0,13
Fracción soluble en alcohol	0,54

Los aminoazúcares se han determinado por el método de Rondle y Morgan (1955) en el polisacárido hidrolizado con HCl 3N durante 2h a 100°C. Por cromatografía en papel se ha identificado la glucosamina (5%) como único aminoazúcar.

La determinación de lípidos libres (0,08%) y ligados (0,13%) se ha llevado a cabo siguiendo el método empleado por Bartnicki-García y Nickerson (1962). Para la determinación de lípidos se ha partido de 3,82 g de esclerocios pulverizados y desecados en estufa. Los esclerocios llevaban creciendo 30 días en placas conteniendo medio judía + 1% glucosa.

Los lípidos y la fracción soluble en alcohol comprenden menos del 1% del esclerocio. En la fracción soluble en alcohol se ha encontrado manitol y trehalosa por cromatografía en papel. El manitol también se ha identificado por cromatografía de gases.

#### 5.- Composición química de las fracciones obtenidas de los esclerocios

Los esclerocios formados en el medio base más 1% de glucosa se recogen a los 15 días, se desecan y se extraen sucesivamente con agua a temperatura ambiente y a 100°C, y con álcali a 60°C para estudiar la naturaleza de sus componentes.

La composición química de las distintas fracciones extraídas de los esclerocios se muestran en la Tabla XI. El principal componente de las fracciones es un glucano. El contenido total de glucosa asciende de 88% (fracción soluble en agua fría) a 98% (fracción soluble en álcali).

TABLA XI. Composición química de las fracciones extraídas de los esclerocios

Fracciones	Tratamiento	Fracción (%) <sup>*</sup>	Composición de la fracción (%)		
			Glucosa	Proteína	Glucosamina
1	Agua a 18°	34	88	12,3	0,0
2	Agua a 100°	14	96	2,3	0,0
3	NaOH 1M a 60°	8	98	0,0	0,0
4	Residuo insoluble	26	85	0,0	12,0

\* Los valores se refieren al porcentaje de las fracciones en los esclerocios secos

El contenido de proteína es de 12,3% en la fracción 1, de 2,3% en la fracción soluble en agua caliente, y no se detecta ni en la fracción 3 ni en la 4. El residuo insoluble se compone del 86% de glucosa y del 12% de glucosamina.

#### 6.- Análisis estructural

##### a) Oxidación con periodato sódico del polisacárido.

Valoración del ácido fórmico en la mezcla de oxidación.

Degradación de Smith. Identificación de los productos resultantes por cromatografía en papel.

Una suspensión del polisacárido (1 mg/ml) procedente de cada una de las fracciones obtenidas en los esclerocios se trata con 1 volumen igual de periodato sódico hasta que las lecturas de la densidad óptica se mantengan constantes, en este caso a las 144 horas. El consumo de periodato y la producción de ácido fórmico por mol de residuo de glucosa se indica en la Tabla XII.

Conocidos los moles de periodato consumidos y el ácido fórmico producido se calcula el porcentaje de enlaces  $1 \rightarrow 6$ ,  $1 \rightarrow 4$  y  $1 \rightarrow 3$  de los polisacáridos según el esquema de Jeanes (1965). En la Tabla XIII se indica el porcentaje de los distintos enlaces hallados en las fracciones obtenidas de los esclerocios de B. cinerea.

Los productos resultantes de la degradación de Smith de los polisacáridos oxidados con periodato, una vez hidrolizados con HCl 3N durante 2h a 100°C, se identifican por cromatografía en papel como glucosa y glicerol en todas las fracciones. En el residuo insoluble se detecta también glucosamina. Para el revelado de la cromatografía se utiliza nitrato de plata amoniacal (Hough y Jones, 1962).

TABLA XII. Consumo de  $\text{NaIO}_4$  y producción de ácido fórmico  
( $\mu\text{moles/residuo hexosa}$ ) durante la oxidación con  
periodato de las fracciones de los esclerocios

Polisacáridos	$\mu\text{moles IO}_4^-$	$\mu\text{moles ac. fórmico}$
Glucosa	4,28	4,40
Fracción 1	0,36	0,19
Fracción 2.	0,44	0,20
Fracción 3	0,50	0,14
Fracción 4	0,46	0,17



TABLA XIII. Enlaces (%) de los polisacáridos de las fracciones de los esclerocios

Polisacárido	1 $\rightarrow$ 6	1 $\rightarrow$ 4	1 $\rightarrow$ 3
Fracción 1	19,4	0,0	80,6
Fracción 2	20,0	4,0	76,0
Fracción 3	14,4	21,4	64,2
Fracción 4	17,5	11,5	71,0

b) Espectroscopía infrarroja de los esclerocios totales y de las distintas fracciones

Los espectros de los esclerocios pulverizados y de las distintas fracciones obtenidas a partir de ellos se muestran en la Fig. 21. La banda de absorción a  $890\text{ cm}^{-1}$ , característica de los  $\beta$ -glucanos, aparece en todas las fracciones. Las bandas de absorción a  $1650$  y  $1550\text{ cm}^{-1}$ , características de proteínas, aparecen en los espectros de los esclerocios totales y de la fracción 1 y 2. El espectro de la fracción 3 muestra una pequeña banda de absorción a  $1550\text{ cm}^{-1}$  de acuerdo con su bajo contenido en proteína. El residuo insoluble o fracción 5, muestra a  $1550\text{ cm}^{-1}$  la banda de absorción asignada a los grupos amida y que en este caso debe ser propia de la quitina, ya que no se encuentra proteína en esta fracción. Los resultados obtenidos por espectroscopía infrarroja coinciden con los obtenidos por análisis químico.

7.- Polisacárido presente en las distintas fracciones obtenidas de esclerocios germinados.

Para estudiar las diferencias existentes en el contenido de polisacárido en cada una de las fracciones de los esclerocios germinados se recolectan esclerocios crecidos durante 36 días en medio judía + 1% de glucosa, parte se desecan a  $45^{\circ}\text{C}$  (controles) y parte se congelan durante 2 días y se depositan junto a un ventana según el procedimiento descrito en materiales y métodos. A los 5 días se aprecian trazas de germinación en algunos esclerocios, 3 días después casi todos los esclerocios están germinados aunque todavía no es muy espesa la masa de conidióforos. Transcurri-

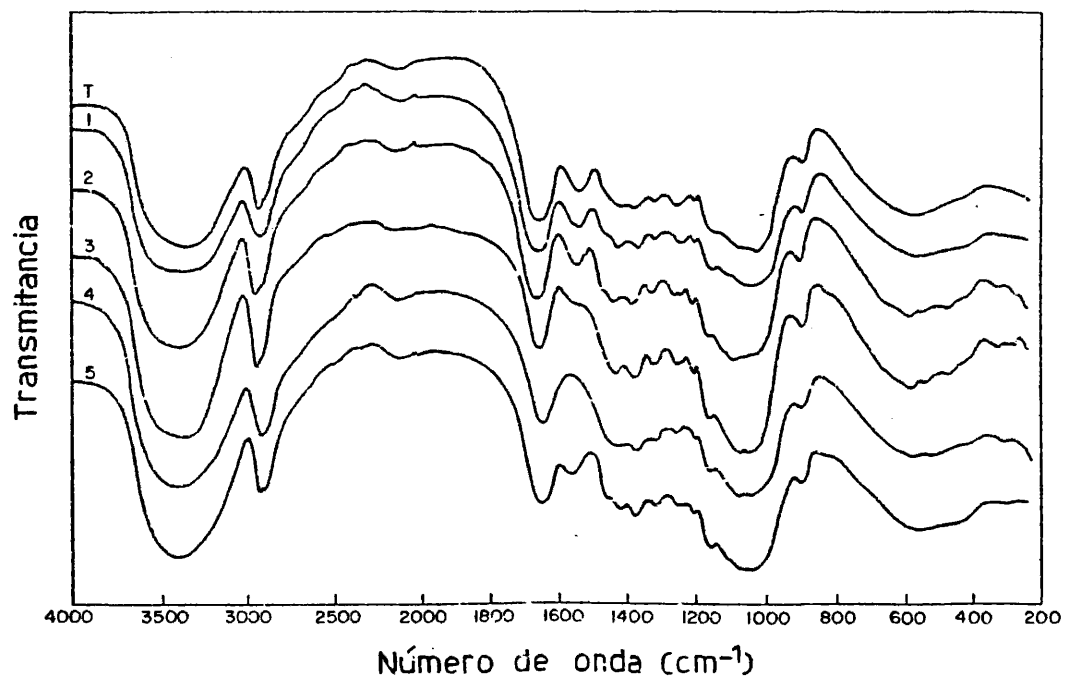


Fig. 21. Espectros infrarrojos de los esclerocios y sus fracciones: T, esclerocio total; 1 y 2 material extraído con agua a 18°C; 3, material extraído con agua a 100°C; 4, material extraído con NaOH 1M a 60°C; y 5, residuo insoluble.

dos 22 días (Fig. 22) los esclerocios germinados se desecan a 45°C en estufa de aire caliente, y tanto los germinados como los controles se extraen con alcohol del 80% a 80°C. Con la fracción soluble en alcohol se hace cromatografía en papel que nos revela que la concentración de manitol y trehalosa es unas 12 veces superior en los esclerocios germinados que en los controles. Con el residuo se procede a hacer una extracción fraccionada para ver la utilización del polisacárido y el posible enriquecimiento en quitina. Durante las extracciones hay mucha pérdida de material.

87

Fig. 22. Esclerocios germinados: a) a los 15 días de germinación (x 3); b) y c) detalle de esclerocios germinados mostrando la masa de conidióforos (x 40).

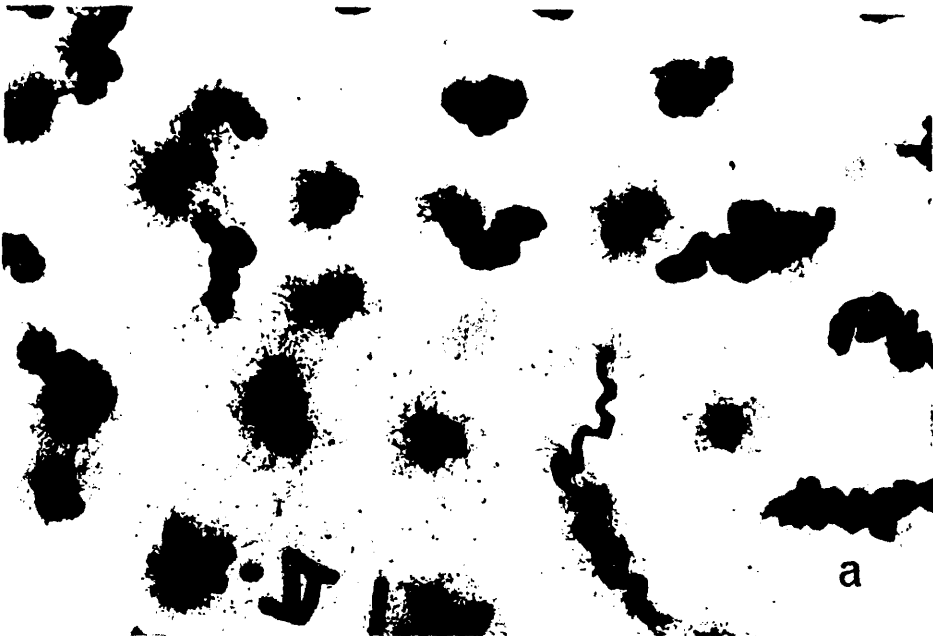


Fig. 22

704

#### IV.- ULTRAESTRUCTURA DE LOS ESCLEROCIOS DE B. CINEREA EN ESTADO LATENTE Y GERMINADOS

##### 1.- Diferenciación y estructura de los esclerocios

Utilizamos las técnicas de microscopía electrónica para conocer la ultraestructura de los esclerocios, los cambios morfológicos durante el proceso de maduración y germinación y la localización de los polisacáridos. Para ello se recolectan los esclerocios en diferentes estadios de su formación y el micelio próximo al esclerocio en diferentes tiempos de crecimiento y se tratan para hacer cortes ultrafinos. También se tratan los esclerocios germinados.

Los primordios de los esclerocios aparecen a los 6 días de incubación como una pequeña convexidad de una masa de hifas entrelazadas y no pigmentadas variables en tamaño y aproximadamente de 1 mm de grosor. Si la masa de hifas es grande, se pueden formar varios primordios. En las secciones ultrafinas, los primordios (Fig. 23a) y la masa de hifas que les rodea son semejantes en estructura y disposición. Las hifas están libres e incluidas en una matriz de polisacárido. En este estadio no se ha observado la capa externa de células pseudomarenquimatosas (corteza) que rodea a los esclerocios maduros.

A los 11 días de incubación los esclerocios son de color oscuro y se desprenden fácilmente de la masa de hifas entrelazadas de los alrededores. La corteza está bien diferenciada y comprende tres capas de hifas (Fig. 24b). Su protoplasma está lleno de orgánulos y de pequeñas vacuolas rodeadas de membranas (Fig. 23b). En la médula no se aprecian



cambios con relación a las secciones de los primordios de 6 días. Las hifas de la médula están distribuidas libremente en una matriz de polisacáridos (Fig. 23c, d y 24a). El micelio próximo al esclerocio aparece muy vacuolizado y en proceso de autólisis (Fig. 23e).

A los 34 días, en los esclerocios, las células de la corteza y médula contienen grandes vacuolas (Figs. 24b y d). El micelio que los rodea está en un estado muy avanzado de autólisis. En las secciones sólo se ven restos de paredes y membranas (Fig. 24c).

Los esclerocios maduros varían en forma y tamaño. Generalmente, el esclerocio parece como una copa invertida, de varios mm de diámetro, y con una pared de un grosor aproximado de 1 mm. Un esclerocio está formado por una médula de hifas entrelazadas y recubiertas por una corteza negra compuesta de tres capas de células. Las hifas de la médula tienen un diámetro de  $3,5\text{ }\mu\text{m}$  y la pared tiene un espesor de  $0,5\text{ }\mu\text{m}$ . Los espacios entre las hifas (alrededor de  $3\text{ }\mu\text{m}$ ) están rellenos por una matriz de polisacárido. Las células de la corteza tienen un diámetro aproximado de  $7\text{ }\mu\text{m}$  y la pared tiene un grosor de  $0,3\text{ }\mu\text{m}$ . Están ordenadas en tres capas, con las paredes celulares en contacto como un pseudoparénquima.

## 2.- Esclerocios germinados

La germinación de los esclerocios de B. cinerea es de tipo esporogénico. El material estudiado estaba en avanzado estado de germinación. Las secciones de la región medular muestran hifas germinativas rodeadas por los restos de células de la médula (Fig. 25a). El citoplasma de las hi-

fas germinativas contiene mitocondrias, otros orgánulos y grandes vacuolas con contenido esferiodal denso (Fig. 25c). Las células de la corteza aparecen vacías. Las hifas germinativas rompen la corteza, saliendo en ramilletes en distintos puntos y convirtiéndose en conidióforos (Fig. 25b y d).

Fig. 23. Fotografías al microscopio electrónico de secciones ultrafinas de esclerocios:

- a) Corte longitudinal de la región septal (S) de una hifa medular de un primordio de esclerocio (6 días), x 6400
- b) Sección de una célula de la corteza (11 días). La pared está en contacto con las hifas adyacentes. x 11600
- c) Hifas de la región medular, corte longitudinal y transversal (11 días). El citoplasma es rico en orgánulos. x 6400
- d) Médula (11 días). Hifas (CM) incluidas en una matriz de Polisacárido (P). x 6400
- e) Hifas rodeando al esclerocio (11 días). La disposición es similar a las de la médula, pero las hifas (CmD) están en avanzado estado de degeneración. CM = Célula medular; CmD = célula micelial degenerada; P = Polisacárido; S = Septo.

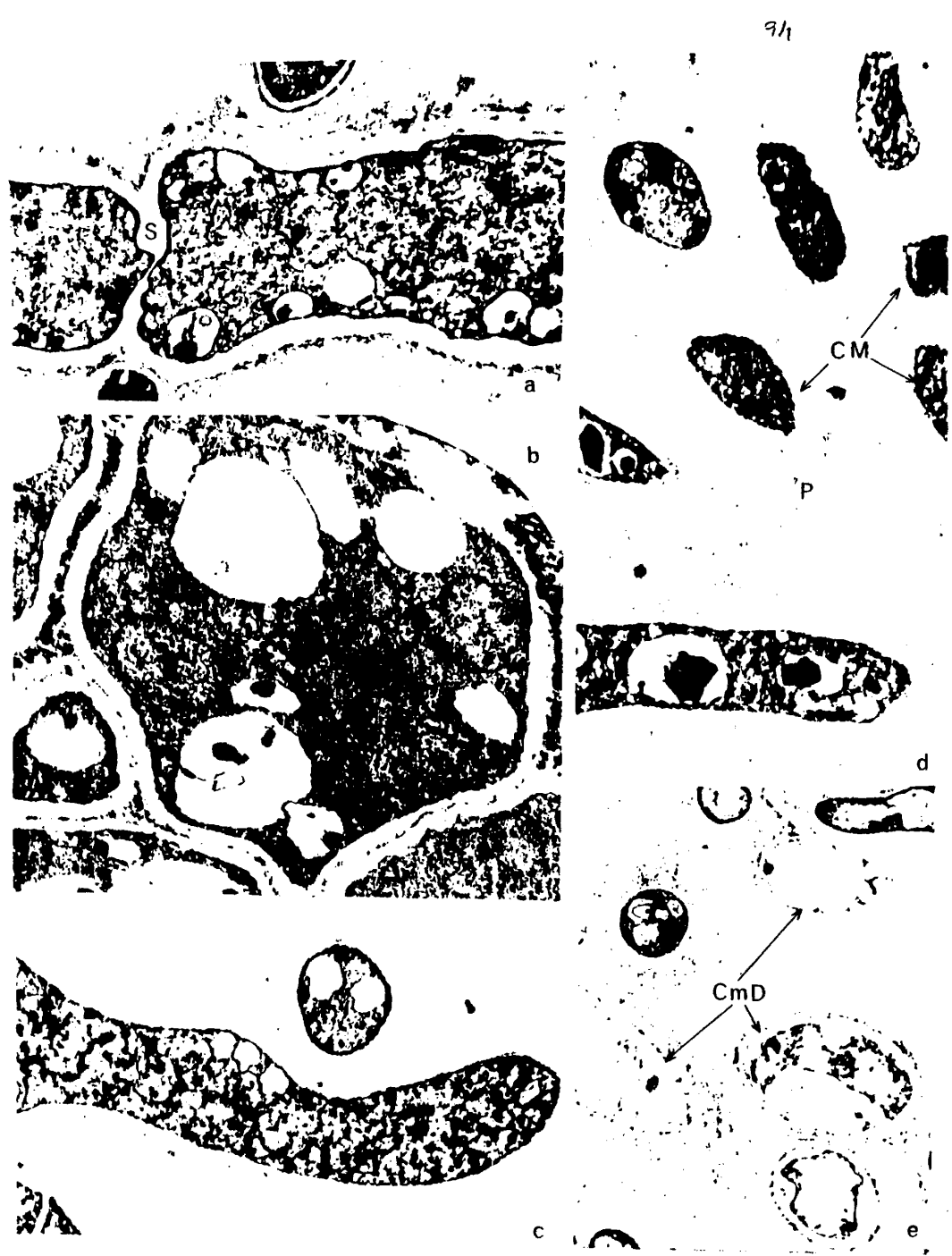


Fig.23

Fig. 24 Fotografías al microscopio electrónico de secciones ultrafinas de esclerocios:

a) Corte transversal de una hifa medular (11 días). La gruesa pared (Pa) está rodeada de fibrillas de polisacárido (P). x 20500.

b) Corteza (11 días) mostrando tres capas de hifas (Co) y la médula adyacente (M). x 5400

c) Hifas rodeando al esclerocio (34 días), mostrando un avanzado estado de autólisis (CmD). x 6400

d) Médula (34 días) grandes vacuolas (CM) y polisacárido (P) rodeando a las hifas. x 6300.

Pa = Pared; P = polisacárido; Co = corteza;

M = médula; CM = célula medular; CmD = célula micelial degenerada.

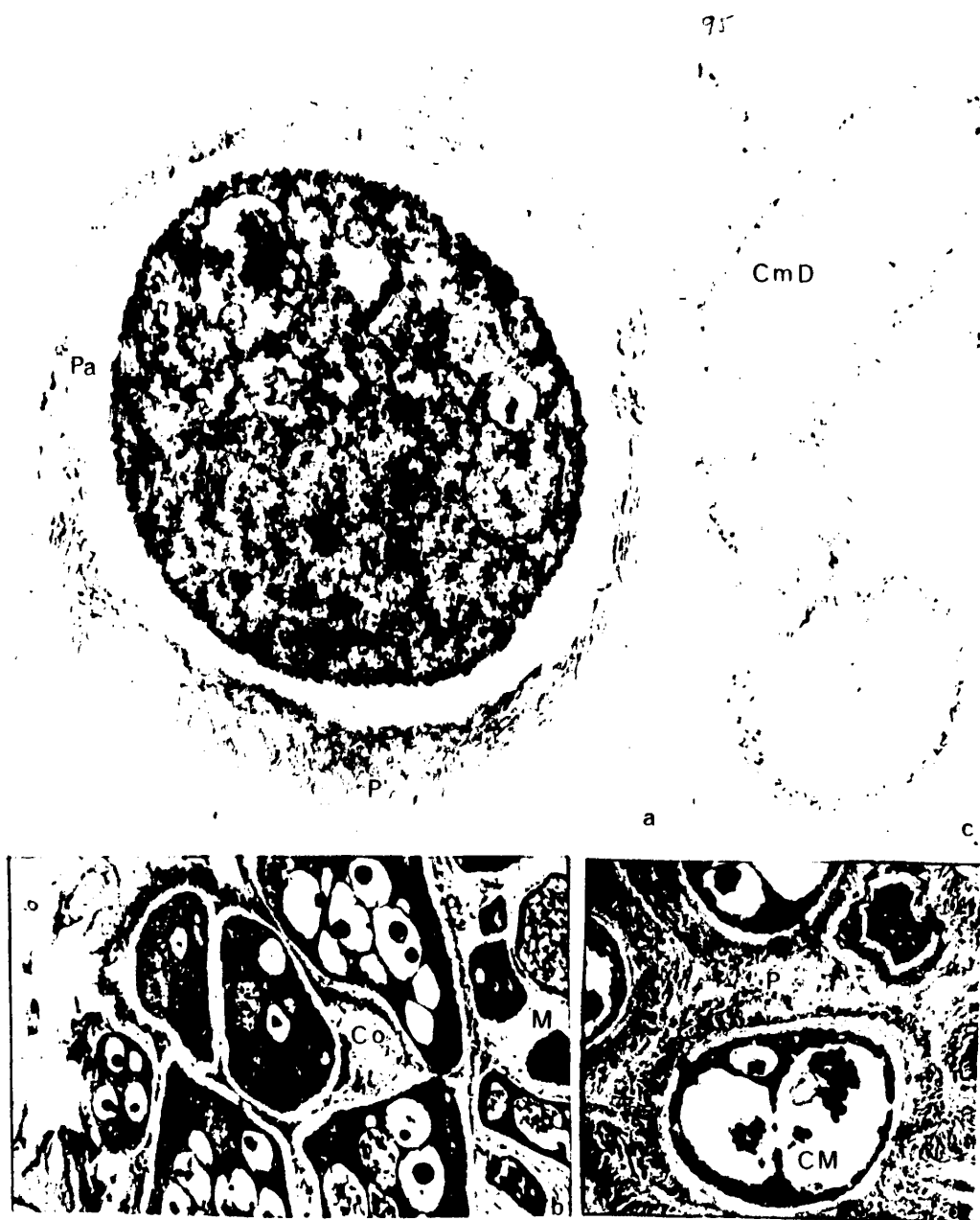


Fig.24

Fig. 25. Fotografías al microscopio electrónico de secciones ultrafinas de esclerocios germinados:

- a) Región medular de un esclerocio germinado mostrando el nuevo micelio (HG) rodeado por restos de células medulares (CMD). x 3600.
- b) Corte longitudinal de una hifa germinativa fuera del esclerocio. x 9600.
- c) Corte transversal oblicuo de una hifa germinativa dentro del esclerocio. x 14400.
- d) Células de la corteza con vacuolas (V) e hifas germinativas (HG). x 5100.

CMD = célula medular degenerada; HG = hifa germinativa; CCoD = célula de la corteza degenerada;

S = septo; V = vacuola



Fig.25



## DISCUSION

El polisacárido extracelular producido por la estirpe de Botrytis cinerea aislada en nuestro laboratorio es un  $\beta$ -glucano con 66% de enlaces (1  $\rightarrow$  3), 23% (1  $\rightarrow$  6) y 11% (1  $\rightarrow$  4), contiene además 3-4% de galactosamina y un 4-5% de proteína. El tipo de enlaces se ha estudiado por oxidación con periodato encontrándose que el polisacárido consume 0,57 moles de periodato con formación de 0,23 moles de ácido fórmico por mol de glucosa. El espectro infrarrojo es característico de un  $\beta$ -glucano (banda de absorción a  $890\text{ cm}^{-1}$ ) en el que predominan los enlaces (1  $\rightarrow$  3). Es muy parecido al espectro del glucano de la avena que también tiene algunos enlaces (1  $\rightarrow$  4) (Michell y Scurfield, 1970).

Otras estirpes de B. cinerea producen  $\beta$ -glucanos con enlaces (1  $\rightarrow$  3) y ramificaciones en (1  $\rightarrow$  6) (Dubordieu y col., 1978a; Dubordieu y col., 1978b; Montant y Thomas, 1977, 1978). Un polisacárido, tóxico para las hojas de begonia, fue aislado de los cultivos de B. cinerea por Kamoen y Jamart (1973b). Estos autores no estudiaron la estructura del polisacárido, pero encontraron en sus hidrolizados galactosa, glucosa, manosa y ramnosa. El polisacárido estudiado por nosotros tiene cierto parecido en cuanto a composición y estructura al aislado por Dubordieu y col (1978a) y Montant y Thomas (1977, 1978) diferenciándose por contener enlaces (1  $\rightarrow$  4) y galactosamina. Dado que estos autores utilizan estirpes aisladas de uvas, mientras que el estudiado por nosotros fue aislado de placas expuestas al aire, desconociéndose la planta a la que parasita, las diferencias pueden deberse a la distinta procedencia de las cepas o al

efecto de los medios de cultivo.

No se conoce bien la función de los polisacáridos extracelulares. Dubordieu y col (1978b) consideran que sirve de reserva hidrocarbonada ya que cuando se consume la fuente de carbono el polisacárido desaparece del medio de cultivo. También han encontrado que utilizando el polisacárido como única fuente de carbono el microorganismo crece. El polisacárido encontrado por nosotros no desaparece del medio de cultivo, aún en los muy viejos en los que la fuente de carbono se ha consumido con anterioridad y en los que la autólisis del micelio ha alcanzado más del 50%. Esto puede considerarse como otra diferencia en la estructura del polisacárido o en la actividad enzimática del microorganismo. A la vista de esto resultaría interesante estudiar la capacidad de producción de polisacárido de cepas de B. cinerea aisladas de diferentes plantas y analizar la composición y estructura de los mismos con el fin de si muestran diferencias utilizarlas como caracteres sistemáticos.

Glucanos con enlaces (1 → 3) y (1 → 6) han sido aislados de otros hongos. Kitahara y Takenchi (1959) obtuvieron el "sclerotan" de los esclerocios de Monilinia libertiana Johnston y col. (1963) estudiaron un polisacárido similar producido por Sclerotium rolfsii y recientemente Santa-maría y col. (1978) han aislado un glucano, relacionado con los anteriores, de los medios de cultivo de Monilinia fructigena. Dado que todos estos hongos forman esclerocios puede existir alguna relación con su capacidad para producir glucanos.

B. cinerea crece y forma polisacárido extracelular en todos los medios sintéticos empleados con diferentes fuentes de carbono y nitrógeno. La máxima producción de polisa-

cárido se obtiene con los azúcares glucosa y lactosa. Con glucosa (20 g/l) y asparagina (4 g/l) la producción de polisacárido es de 33 mg/100 ml de medio a los 10 días de incubación.

Las mejores fuentes de nitrógeno son el nitrato potásico (318 mg polisacárido/100 ml) y el sulfato amónico (246 mg polisacárido/100 ml), y las peores el tartrato diamónico y el ácido aspártico. Estos resultados coinciden con los de otros autores que han estudiado el efecto del medio de cultivo en la producción de polisacárido.

La relación C/N del medio de cultivo tiene un papel importante en la producción de polisacárido que aumenta cuando aumenta el valor de esta relación y decrece cuando esta relación disminuye. Utilizando 20 g/l de glucosa y diferentes concentraciones de asparagina, nitrato potásico o tartrato diamónico se observa una producción máxima de polisacárido cuando el nitrógeno suministrado por estas sustancias es de 0,5, 0,67 y 0,61 g/l respectivamente. Resultados similares se obtienen cuando se mantiene fija la concentración de nitrógeno y se varía la de carbono. Este efecto ha sido descrito en la producción de glucanos por otros hongos (Buck y col., 1968). Por el contrario una relación C/N baja favorece la producción de polisacáridos compuestos principalmente por aminoazúcares (Leal y Rupérez, 1978).

B. cinerea produce esclerocios en un medio compuesto por un cocimiento de judías verdes. La adición de glucosa aumenta la formación, siendo la concentración óptima de glucosa 1 g por 100 ml de medio. Con esta concentración se ha obtenido hasta 465 mg de esclerocios por placa conteniendo 40 ml de medio. En un medio sintético formado por asparagina

1 g/l y diferentes concentraciones de glucosa también se obtienen esclerocios, y el mejor rendimiento (585 mg/placa) se obtiene con una concentración de glucosa de 20 g/l. Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos por otros autores estudiando la formación de esclerocios por diferentes hongos (Peiris, 1947).

La importancia de los esclerocios en la supervivencia del microorganismo, en la que juega un papel primordial su composición y estructura, es bien conocida (Coley-Smith y Cooke, 1971). Los esclerocios de B. cinerea desecados contienen un 75% de carbohidratos, 10% de proteína, 5% de glucosamina y un contenido muy bajo en lípidos y material soluble en alcohol. Aunque existen algunos esclerocios ricos en lípidos, como en el caso del Claviceps purpurea (Mitchell y Cooke, 1968), y en material soluble en alcohol (Le Tourneau, 1966), en la mayoría de ellos abundan los carbohidratos (Ergle, 1948).

La extracción de los esclerocios nos ha permitido obtener cuatro fracciones formadas casi en su totalidad por  $\beta$ -glucano (Tabla XI). La primera fracción, material soluble en agua a 18°C, representa el 34% y contiene un 88% de glucosa y 12% de proteína. La segunda fracción, soluble en agua a 100°C, representa el 14% y contiene 96% de glucosa y 2,3% de proteína. La tercera fracción, soluble en NaOH 1M, representa el 8% y contiene 98% de glucosa. La cuarta fracción es el material insoluble (26%) y parece ser un complejo de glucano-quitina formado por un 85% de glucosa y 12% de glucosamina. Este complejo es frecuente en las paredes de los hongos (Sietsma y Wessels, 1979).

Los resultados de los análisis químicos de estas fracciones concuerdan con los espectros infrarrojos donde puede apreciarse la semejanza de dichos espectros en la región comprendida entre  $1400$  y  $800\text{ cm}^{-1}$  en la que aparecen las bandas de absorción más características de los carbohidratos. La banda a  $890\text{ cm}^{-1}$  y la ausencia de banda de absorción a  $850\text{ cm}^{-1}$  las caracteriza como polisacáridos con configuración  $\beta$  (Brimacombe y Webber, 1964). Las bandas de absorción a  $1550\text{ cm}^{-1}$  corresponden al grupo  $-\text{CO}-\text{NH}-$  que aparece en las proteínas y en los N-acetil-amino azúcares. En las fracciones 1 y 2 se deben a las proteínas y en la 4 a la quitina. Las proteínas que aparecen en las primeras fracciones pueden ser contaminantes o formar parte del polisacárido.

Tanto la composición como los espectros infrarrojos de las fracciones extraídas de los esclerocios son muy parecidos a los del polisacárido extracelular. Sin embargo, las diferencias en solubilidad indican diferencias en el tipo de enlaces. Los tipos de enlaces determinados mediante oxidación con periodato sódico revelan ciertas diferencias entre las fracciones y con el polisacárido extracelular. Mediante este método no es posible determinar las ramificaciones, pudiéndose dar como enlaces  $(1 \rightarrow 3)$  los  $(1 \rightarrow 6)$  o los  $(1 \rightarrow 4)$  cuando en los grupos  $-\text{OH}$  libres de los monómeros que participan en estos enlaces se une otro azúcar. Sólo mediante el análisis de los productos de la metilación de estos polisacáridos podrá conocerse su estructura. Las fracciones solubles en agua podrían ser parecidas al polisacárido extracelular producido por el hongo en medios líquidos y formar, en los esclerocios, la matriz que rodea las

hifas (Fig. 23d y 24d). Mientras que el polisacárido soluble en álcali y el residuo insoluble formarían las paredes de las hifas del esclerocio.

Los intentos para demostrar la utilización de algunas de estas fracciones durante la germinación han sido infructuosos, debido al escaso material utilizado, al diferente grado de germinación de los esclerocios y a las pérdidas de material durante el largo proceso de extracción. Sin descartar la posibilidad de que algunos de estos polisacáridos sean utilizados como material de reserva, creemos que su función principal es la de protección de las hifas, especialmente contra la desecación. En este sentido también juega un importante papel la envoltura externa (Fig. 24b) formada por tres capas de células pseudoparenquimatosas cuyas paredes oscuras contienen melanina que protegerían al esclerocio del ataque enzimático por otros hongos (Kuo y Alexander, 1967; Bull, 1970a).

Uno de los aspectos más importantes en la biología de B. cinerea es la germinación de los esclerocios por su trascendencia en la supervivencia del hongo en el suelo y la infección de la planta huésped en subsiguientes cultivos. No existen estudios sobre el tiempo durante el cual los esclerocios de B. cinerea pueden mantener la capacidad de germinar. Coley-Smith y Cooke (1971) recopilaron de la literatura los tiempos a los que se han obtenido germinación de esclerocios de diversos hongos. Los esclerocios de B. convoluta germinan en un 70% al año de recolectados y los de B. tulipae en un 52% a un 100% a los quince meses. En muchos casos la capacidad germinativa de los esclerocios perdura mucho más tiempo, sobresaliendo los del Verticillium dahliae var albo-atrum que germinaron después de trece años. En el

trabajo objeto de este tesis no nos proponíamos estudiar la capacidad germinativa de los esclerocios en función del tiempo, sino hacerlos germinar para estudiar los cambios que sufren durante este proceso en composición y ultraestructuralmente. Se han obtenido altos porcentajes de germinación de esclerocios de hasta tres meses.

Las condiciones que favorecen la germinación de los esclerocios interrumpiendo el periodo de reposo, en general, no han sido bien estudiadas. Una discusión sobre estos aspectos aparece en la revisión de Coley-Smith y Cooke (1971). Hemos conseguido altos porcentajes de germinación de esclerocios de B. cinerea sometiéndolos después de recolectados a  $-11^{\circ}\text{C}$  y manteniéndolos posteriormente en cámara húmeda, próximos a una ventana a temperatura ambiente. La germinación es del tipo esporogénico (Butler y Jones, 1949). A los 8 ó 10 días de interrumpir el periodo de reposo empiezan a aparecer hifas que unos pocos días después se convierten en conidióforos típicos de Botrytis (Figs. 22b y c). Los esclerocios de este hongo cuando proceden del cruce de dos estirpes compatibles germinan mediante carpóforos, produciendo el estado perfecto, Botryotinia fuckeliana (Groves y Drayton, 1939).

La morfogénesis de los esclerocios en hongos filamentosos ha sido poco estudiada y cuando se ha estudiado ha sido sólo en las primeras fases del desarrollo ya que resulta imposible la observación microscópica debido a la acumulación de hifas. En 1887 ya se conocía la estructura de muchos esclerocios maduros aunque se desconocía su desarrollo. De Bary (1887) consideró que los tejidos de los esclerocios estaban formados por hifas, y que debían su estructura parenquimariosa simplemente a la firme unión de sus hifas,

y a la forma, expansión y colocación de sus células. De Barry también llegó a la conclusión de que los esclerocios maduros de muchas especies eran similares en muchos caracteres importantes.

Posteriormente Townsend y Willetts (1954) estudiaron el desarrollo y estructura de los esclerocios al microscopio óptico. Entre los esclerocios que estudiaron se encuentran los de B. cinerea, que por su iniciación consideraron del tipo terminal por formarse al ramificarse dicotómicamente las hifas y entrelazarse posteriormente. En cuanto a su estructura encontraron que estaban formados por una capa externa "rind" formada por dos o tres capas de células redondeadas, una capa más interna "cortex" formada por cinco o seis capas de células pseudoparenquimatosas de paredes finas, y una región central, la médula, formada por células filamentosas libres.

En nuestras investigaciones hemos observado que los esclerocios se inician en unas placas de hifas densamente entrelazadas que pueden tener más de  $1\text{ cm}^2$  de superficie y aproximadamente 1 mm de grosor. Hacia el sexto día de crecimiento ciertas zonas de estas placas se abomban siendo el primer indicio del esclerocio, que permanece íntimamente unido al micelio que le rodea. Los cortes ultrafinos del material de la placa y posterior observación al microscopio electrónico, tanto de la zona de iniciación del esclerocio como de la que le rodea, revelan una estructura semejante. Las hifas se encuentran libremente dispuestas en una matriz de polisacárido. En este material no encontramos ninguna estructura especial en la capa externa. En los días que siguen los primordios de los esclerocios empiezan a oscurecerse.



El material procesado y examinado a los 11 días muestra pocos cambios en la médula. En el micelio que rodea a los esclerocios se observan hifas vacías y en proceso de autólisis. Los esclerocios se han independizado del micelio que les rodea y se separan fácilmente de éste. Rodeando a la médula se observan tres capas de células redondeadas pseudoparenquimatosas que constituyen lo que Townsend y Willetts (1954) denominaron "rind". Estas células son muy oscuras debido a la melanina. Nosotros nos hemos encontrado la segunda capa de células pseudoparenquimatosas denominada "cortex" por los autores citados. Esto puede deberse al estado de desecación de los esclerocios pues resulta lógico pensar que al perder agua, las capas más externas pueden compactarse uniéndose sus paredes para formar un pseudoparenquima o puede deberse a variaciones entre las diferentes cepas.

Los esclerocios germinan produciendo conidióforos que emergen de la capa externa del esclerocio en grupos. Cuando los esclerocios germinados se observan al microscopio electrónico se ven en su interior hifas jóvenes entre restos de células medulares y de polisacárido.

## CONCLUSIONES

1) Botrytis cinerea Pers. ex Fr. produce en el medio de cultivo un polisacárido extracelular compuesto por glucosa (92-95%) y galactosamina (3-4%).

2) El espectro infrarrojo del polisacárido muestra bandas de absorción a  $890\text{ cm}^{-1}$  y ausencia de absorción a  $850\text{ cm}^{-1}$  lo que indica la existencia de enlaces glicosídicos con configuración  $\beta$ .

3) Mediante la oxidación del polisacárido con  $\text{NaIO}_4$  y la degradación de Smith se ha comprobado que los residuos de azúcar en el polisacárido se encuentran unidos por enlaces  $1 \rightarrow 3$  (66%), enlaces  $1 \rightarrow 6$  (23%) y enlaces  $1 \rightarrow 4$  (11%).

4) El polisacárido es poco soluble en agua una vez precipitado del medio de cultivo por la adición de alcohol.

5) B. cinerea crece y forma polisacárido en todos los medios sintéticos empleados con diferentes fuentes de carbono, obteniéndose los mejores resultados con glucosa y lactosa.

6) La concentración de glucosa óptima para la formación de polisacárido es de 20 g/l.

7) La fuente de nitrógeno empleada influye en la producción de polisacárido. Las mejores fuentes de nitrógeno son el nitrato potásico y el sulfato amónico. Se produce polisacárido con todos los aminoácidos probados.

8) La relación C/N alta favorece la formación de polisacárido. Se han obtenido rendimientos de polisacárido de 318 mg/100 ml de medio con 20 g de glucosa y 0,67 g de nitrato potásico.

9) La tiamina no influye en la producción de polisacárido.

10) La producción de polisacárido en cultivos estáticos disminuye con la relación superficie/volumen.

11) El polisacárido no es utilizado por el microorganismo como reserva de carbono, ya que no es degradado cuando se agota la glucosa del medio.

12) La adición de glucosa favorece la formación de esclerocios tanto en un medio sintético como en un medio con teniendo extracto de judías.

13) La concentración óptima de glucosa es de 20 g/l para el medio sintético y de 1 g/l para el medio conteniendo extracto de judías.

14) Los factores luz y temperatura influyen en la formación de esclerocios.

15) Los principales componentes químicos encontrados en los esclerocios son: glucosa (75%), glucosamina (5%), y proteína (10%). Trehalosa, manitol y lípidos representan menos del 1%.

16) La extracción de los esclerocios nos ha permitido obtener cuatro fracciones formadas casi en su totalidad por  $\beta$ -glucanos. La primera fracción, material soluble en agua a 18°C, contiene un 88% de glucosa y 12% de proteína. La segunda fracción, soluble en agua a 100°C, contiene 96% de glucosa y 2,3% de proteína. La tercera fracción, soluble en NaOH 1M, contiene 98% de glucosa. La cuarta fracción, material insoluble, parece ser un complejo de glucano-quitina formado por un 85% de glucosa y 12% de glucosamina.

17) Mediante la oxidación del polisacárido con  $\text{NaIO}_4$  y la degradación de Smith se ha comprobado que los residuos de azúcar en los polisacáridos de las fracciones de los esclerocios se encuentran unidos de la siguiente manera: fracción 1, enlaces 1  $\rightarrow$  3 (80,6%) y enlaces 1  $\rightarrow$  6 (19,4%); fracción 2, enlaces 1  $\rightarrow$  3 (76%), enlaces 1  $\rightarrow$  6 (20%) y enlaces 1  $\rightarrow$  4 (4%); fracción 3, enlaces 1  $\rightarrow$  3 (64,2%), enlaces 1  $\rightarrow$  6 (14,4%) y enlaces 1  $\rightarrow$  4 (21,4%); fracción 4, enlaces 1  $\rightarrow$  3 (71%) enlaces 1  $\rightarrow$  6 (17,5%) y enlaces 1  $\rightarrow$  4 (11,5%).

18) Los espectros infrarrojos de las distintas fracciones muestran bandas de absorción a  $890\text{ cm}^{-1}$  y ausencia de absorción a  $850\text{ cm}^{-1}$  lo que indica la existencia de enlaces glicosídicos con configuración  $\beta$ .

19) Las diferencias en solubilidad indican diferencias en el tipo de enlaces.

20) El polisacárido extracelular se diferencia de las fracciones solubles en agua de los esclerocios en que el extracelular contiene galactosamina.

21) Hemos conseguido germinación de los esclerocios sometiéndolos a  $-11^{\circ}\text{C}$  durante 24 h y manteniéndolos después en cámara húmeda. A los 15 días el 90% de los esclerocios habían germinado.

22) La concentración de manitol y trehalosa es superior en los esclerocios germinados que en los no germinados.

23) Los primordios de los esclerocios aparecen a los 6 días de incubación. Los primordios y las hifas que los rodean son semejantes en estructura y disposición. En los primordios no se observa capa de células pseudoparenquimatosas (corteza).

24) A los 11 días de incubación los esclerocios son de color oscuro, la corteza está bien diferenciada y comprende tres capas de hifas. El protoplasma contiene orgánulos y pequeñas vacuolas. Las hifas de la médula están distribuidas en una matriz de polisacárido. El micelio próximo al esclerocio aparece vacuolizado y en proceso de autólisis.

25) A los 34 días de incubación la corteza y médula de los esclerocios contienen grandes vacuolas y los espacios entre las hifas están rellenos por una matriz de polisacárido. El micelio de alrededor presenta un estado muy avanzado de autólisis.

26) La germinación de los esclerocios es de tipo esporogénico. La región medular muestra hifas germinativas que rompen la corteza (cuyas células aparecen vacías), saliendo en ramilletes en distintos puntos y convirtiéndose en conidióforos.

BIBLIOGRAFIA

- ALLINGTON, W.B. (1936). Sclerotial formation in Rhizoctonia solani as affected by nutritional and other factors. Phytopathology 26, 831-844.
- APPLEGARTH, D.A. & BOZOIAN, G. (1969). Cell wall of Helminthosporium sativum. Archives of Biochemistry and Biophysics 134, 285-289.
- ARAKI, Y., TAKADA, H., FUJII, N. & ITO, E. (1979). A pathway of polygalactosamine formation in Aspergillus parasiticus. Enzymatic deacetylation of N-acetylated polygalactosamine. European Journal Biochemistry 102 35-42.
- ARONSON, J.M. (1965). The cell wall. En: The Fungi I, 49-76. Editado por Ainsworth, G.C. and Sussman, A.S. Academic Press, New York and London.
- ARONSON, J.M. & MACHLIS, L. (1959). The chemical composition of the hyphal walls of the fungus Allomyces. American Journal of Botany 46, 292-300.
- ASPINALL, G.O. & FERRIER, R.J. (1957). A spectrophotometric method for the determination of periodate consumed during the oxidation of carbohydrates. Chemistry and Industry 1216.
- BACON, J.S.D., DAVIDSON, E.D., JONES, D. & TAYLOR, I.F. (1966). The location of chitin in the yeast cell wall. Biochemical Journal 101, 36c-38c.

- BACON, J.S.D., JONES, D., FARMER, V.C. & WEBLEY, D.M. (1968). The occurrence of  $\alpha(1 \rightarrow 3)$  glucan in Cryptococcus, Schizosaccharomyces and Polyporus species and its hydrolysis by a Streptomyces culture filtrate lysing cell walls of Cryptococcus. Biochimica et Biophysica Acta 158, 313-315.
- BARDALAYE, P.C.; NORDIN, J.H. (1976). Galactosaminegalactan from cell walls of Aspergillus niger. Journal of Bacteriology, 125, 655-669.
- BARKER, S.A., BOURNE, E.J. & WHIFFEN, D.H. (1956). Use of Infrared Analysis in the determination of Carbohydrate Structure. Methods of Biochemical Analysis 3, 213-245.
- BARTNICKI-GARCIA, S. (1968). Cell wall chemistry, morphogenesis, and taxonomy of Fungi. Annual Review of Microbiology, 22, 87-108.
- BARTNICKI-GARCIA, S. & NICKERSON, W.J. (1962). Isolation, composition and structure of cell walls of filamentous and yeast-like forms of Mucor rouxii. Biochimica et Biophysica Acta 58, 102-119.
- BARTNICKI-GARCIA, S. & REYES, E. (1968). Polyuronides in the cell walls of Mucor rouxii. Biochimica et Biophysica Acta 170, 54-62.
- BLOOMFIELD, R. & ALEXANDER, M. (1967). Melanins and resistance of fungi to lysis. Journal of Bacteriology 93, 1276-1280.
- BOUVENG, H.O. KIESSLING, H., LINDBERG, B. & MCKAY, J. (1962). Polysaccharides elaborated by Pullularia pullulans. Part. I: the neutral glucan synthesized from sucrose solutions. Acta Chemica Scandinavica 16, 615-622.



- BRIMACOMBE, J.S. & WEBBER, J.M. (1964). Mucopolysaccharides: Chemical structure, distribution and isolation. American Elsevier Publishing Company, New York. BBA Library, Vol. 6.
- BUCK, K.W., CHEN, A.W., DICKERSON, A.G. & CHAIN, E.B. (1968). Formation and structure of extracellular glucans produced by Claviceps species. Journal of General Microbiology 51, 337-352.
- BULL, A.T. (1970a). Inhibition of polysaccharidases by melain: enzyme inhibition in relation to mycolysis. Archives of Biochemistry and Biophysics 137, 345-356.
- BULL, A.T. (1970b). Chemical composition of wild-type and mutant Aspergillus nidulans cell walls. The nature of polysaccharide and melanin constituents. Journal of General Microbiology 63, 75-94.
- BULL, A.T. & CHESTERS, C.G.C. (1966). The biochemistry of laminarin and the nature of laminarinase. Advances in Enzymology 28, 325-364.
- BUTLER, E.J., JONES, S.G. (1949). Plant Pathology London: Macmillan 979.
- CHET, I. & HENIS, Y. (1968). The control mechanism of sclerotial formation in Sclerotium rolfsii Sacc. Journal of General Microbiology 54, 231-236.
- CHET, I. & HENIS, Y. (1975). Sclerotial morphogenesis in fungi. Annual Review of Phytopathology 13, 169-192.
- CHET, I., HENIS, Y. & MITCHELL, R. (1966). The morphogenetic effect of sulphur-containing amino acids, glutathione and iodoacetic acid on Sclerotium rolfsii Sacc. Journal of General Microbiology 45, 541-546.



- CHUPP, C. & SHERF, A.F. (1960). Vegetable diseases and their control. Ronald Press, New York. pp. 693.
- COLEY-SMITH, J.R. & COOKE, R.C. (1971). Survival and germination of fungal sclerotia. Annual Review of Phytopathology 9, 65-92.
- COOKE, R.C. (1971). Physiology of sclerotia of Sclerotinia sclerotiorum during growth and maturation. Transactions of the British Mycological Society 56, 51-59.
- CROOK, E.M. & JOHNSTON, I.R. (1962). The qualitative analysis of the cell walls of selected species of fungi. Biochemical Journal 83, 325-330.
- DAVIS, E.N., RHODES, R.A. & SHULKE, H.R. (1965). Fermentative production of exocellular glucans by fleshy fungi. Applied Microbiology 13, 267-271.
- DAWSON, R.M.C., ELLIOT, D.C., ELLIOT, W.H. & JONES, K.M. (1962). Data for Biochemical Research. Oxford University Press pp. 299.
- De BARY, A (1887). Comparative morphology and biology of the Fungi, Mycetoza and Bacteria. London & New York: Oxford Clarendon pp. 525.
- DEMETRIADES, S.D. (1953). Etudes sur la biologie du Sclerotinia sclerotiorum (Lib.) Massée III. L'action du magnésium et du soufre sur le développement du champignon et la formation de ses sclérotés. IV. L'utilisation de diverses sources d'azote. Annual Institute Phytopathology Benaki 7, 15-20, 27-35.
- DISCHE, Z. (1947). A new specific color reaction of hexuronic acids. Journal of Biological Chemistry 167, 189-198.

- DISTLER, J.J. & ROSEMAN, S. (1960). Galactosamine polymers produced by Aspergillus parasiticus. Journal of Biological Chemistry 235, 2538-2541.
- DUBORDIEU, D., FOURNET, B., BERTRAND, A. & RIBEREAU-GAYON, P. (1978). Identification du glucane sécrété dans la baie de Raisin par B. cinerea. C.R. Academic Science Paris 286, 229-231.
- DUBORDIEU, D., PUCHEU-PLANTE, B., MERCIER, M. & RIBEREAU-GAYON, P. (1978). Structure, rôle et localisation du glucane exo-cellulaire sécrété par B. cinerea dans la baie de Raisin. C.R. Academic Science Paris 287, 571-573.
- DUDMAN, W.F. (1977). The role of surface polysaccharides in natural environments. En: Sutherland, I.W. ed. Surface Carbohydrates of the prokaryotic cell. Academic Press.
- DURREL, L.W. (1964). The composition and structure of walls of dark fungus spores. Mycopathology Mycological Applied 23, 329-345.
- ERGLE, D.R. (1947). The glycogen content of Phymatotrichum sclerotia. Journal of the American Chemical Society 69, 2061-2062.
- ERGLE, D.R. (1948). The Carbohydrate metabolism of germinating Phymatotrichum sclerotia with special reference to glycogen. Phytopathology 38, 142-151.
- FARKAS, V. (1979). Biosynthesis of cell walls of fungi. Microbiological Reviews 43, 117-144.
- FARR, D.R., SCHULER-HOVANESSIAN, A., & HORISBERGER, M. (1977). Structure of an  $\alpha$ -D-galactosaminoglycan from Physarum polycephalum spherule walls. Carbohydrate Research 59, 151-154.

- FUJIMOTO, M., KUNINAKA, A., YONEI, S., KOHAMA, T., YOSHINO, H. (1969). Occurrence of Malonogalactan in the nucleose preparation from Penicillium citrinum. Agricultural and Biological Chemistry. 33, 1666-1668.
- GARCIA-MENDOZA, C., LEAL, J.A. & NOVAES-LEDIEU, M. (1979). Studies of the spore walls of Agaricus bisporus and Agaricus campestris. Canadian Journal of Microbiology 25, 32-39.
- GORIN, P.A.J. & EVELEIGH, D.E. (1970). Extracellular 2-acetamido-2-deoxy-D-galacto-D-galactan from Aspergillus nidulans. Biochemical 9, 5023-5027.
- GROVES, J.W. & DRAYTON, F.L. (1939). The perfect stage of Botrytis cinerea. Mycologia 31, 485-489.
- GROVES, J.W. & LOVELAND, P.A. (1953). The connection between Botryotinia fuckeliana and Botrytis cinerea. Mycologia 45, 415-425.
- HAMILTON, P.B. & KNIGHT, S.G. (1962). An analysis of the cell walls of Penicillium chrysogenum. Archives of Biochemistry and Biophysics 99, 282-287.
- HAWKER, L.E. (1957). The physiology of reproduction in fungi. London and New York: Cambridge University Press.
- HAY, G.W., LEWIS, B.A. & SMITH, F. (1965). Periodate oxidation of polysaccharides: General procedures. En: Methods in Carbohydrate Chemistry V, 357-361.
- HOUGH, L. & JONES, J.K.N. (1962). Chromatography on paper. En: Methods in Carbohydrate Chemistry I, 21-31.

- HUNSLEY, D. & BURNETT, J.H. (1970). The ultrastructural architecture of the walls of some hyphal fungi. *Journal of General Microbiology* 62, 203-218.
- JEANES, A. (1965). Dextrans. Preparation of dextrans from growing *Leuconostoc* cultures. *Methods in Carbohydrate Chemistry* V, 118-127.
- JEANES, A. (1977). Dextrans and pullulans: Industrially significant  $\alpha$ -D-glucans. En: Sandford, P.A. & Laskin, A. (eds.). *Extracellular Microbial Polysaccharides* American Chemical Society.
- JOHNSON, J., KIRKWOOD, S., MISAKI, A., NELSON, T.E., SCALETTI, J.V. & SMITH, F. (1963). Structure of a new glucan. *Chemistry and Industry* 20, 820-822.
- JOHNSTON, I.R. (1965). The composition of the cell wall of *Aspergillus niger*. *Biochemical Journal* 96, 651-658.
- KABAT, E.A. & MAYER, M.M. (1961). Periodate oxidations. En: Kabat and Mayer's *Experimental Immunochemistry* 542-550. Thomas, C.C. Publisher. Springfield. Illinois. U.S.A.
- KAMOEN, O. & JAMART, G. (1973a). Citroenzuur, een vivotoxine afgescheiden door *Botrytis cinerea* bij aantasting van Begonia. Overdruk uit: Medelingen Faculteit Landbouwwetenschappen Gent XXXVIII, 1445-1454.
- KAMOEN, O. & JAMART, G. (1973b). Een fytotoxisch polysaccharide afgescheiden door *Botrytis cinerea*. Overdruk uit: Medelingen Faculteit Landbouwwetenschappen Gent, XXXVIII 1467-1476.

- KELLENBERGER, E., RYTER, A. & SECHAND, J. (1958). Electron microscope study of DNA-containing plasms. II Vegetative and mature phage DNA as compared with normal bacterial nucleoids in different physiological states. *Journal of Biophysical and Biochemical Cytology* 4, 671-678.
- KIKUMOTO, S., MIYAJIMA, T., YOSHIKUMI, S., FUJIMOTO, S. & KIMURA, K. (1970a) Polysaccharide produced by Schizophyllum commune. I. Formation and some properties of an extracellular polysaccharide. *Journal of Agriculture Chemistry Society* 44, 337-342.
- KIKUMOTO, S., MIYAJIMA, T., KIMURA, K., OKUBO, S. & KOMATSU, N. (1970b). Polysaccharide produced by Schizophyllum commune. II. Chemical structure of an extracellular polysaccharide. *Nippon nokei Kagaku Kaishi* 45, 162-168.
- KITAHARA, M. & TAKEUCHI, Y. (1959). Chemical components of Sclerotia of Sclerotinia libertiana. X. Polyglucosan. *Gifu daigaku nogakubu kenkyu hokoku* 11, 127-132.
- KORN, E.D. & NORTHCOTE, D.H. (1960). Physical and chemical properties of polysaccharides and glycoproteins of the yeast-cell wall. *Biochemical Journal* 75, 12-17.
- KREGER, D.R. (1954). Observations on cell walls of yeasts and some other fungi by X-ray diffraction and solubility tests. *Biochimica et Biophysica Acta* 13, 1-9.
- KUBOTA, T., TOKOROYAMA, T., KAMIKAWA, T. & SATOMURA, Y. (1966). The structures of sclerin and sclerolide, metabolites of Sclerotinia libertiana. *Tetrahedron Letters* 42, 5205-5210.

- KUO, M.J. & ALEXANDER, M. (1967). Inhibition of the lysis of fungi by melanins. *Journal of Bacteriology* 94, 624-629.
- LEAL, J.A., & RUPEREZ, P. (1978). Extracellular polysaccharide production by Aspergillus nidulans. *Transactions of the British Mycological Society* 70, 115-120.
- LEAL-SERRANO, G., RUPEREZ, P. & LEAL, J.A. (1980). Acidic polysaccharide from Aureobasidium pullulans. *Transactions of the British Mycological Society* 75, 57-62.
- Le TOURNEAU, D. (1966). Trehalose and acyclic polyols in sclerotia of Sclerotinia sclerotiorum. *Mycologia* 58, 934-942.
- LOEWUS, F.A. (1952). Improvement in the anthrone method for determination of Carbohydrates. *Analytical Chemical* 24, 219.
- LOWRY, O.H. & LOPEZ, J.A. (1946). The determination of inorganic phosphate in the presence of labile phosphate esters. *Journal of Biological Chemistry* 162, 421-428.
- LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L. & RANDALL, R.J. (1951). Protein measurement with de Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193, 265-275.
- MAHADEVAN, P.R. & TATUM, E.L. (1965). Relationship of the major constituents of the Neurospora crassa cell wall to wild-type and colonial morphology. *Journal of Bacteriology* 90, 1073-1081.
- MARUKAWA, S., FUNAKAWA, S. & SOTOMURA, Y. (1975). Role of sclerin on morphogenesis in Sclerotinia sclerotiorum de Bary (including S. libertiana Fuckel). *Agricultural and Biological Chemistry Bulletin* 39, 645-650.

- MICHELL, A.J. & SCURFIELD, G. (1970). An assesment of Infrared Spectra as indicators of Fungal cell wall composition. *Australian Journal of Biological Science* 23, 345-360.
- MITCHELL, D.T. & COOKE, R.C. (1968). Water uptake, respiration pattern and lipid utilization in sclerotia of Claviceps purpurea during germination. *Transactions of the British Mycological Society* 51, 731-736.
- MONTANT, Ch. & THOMAS, L. (1977). Structure d'un glucane exocellulaire produit per le Botrytis cinerea (Pers.). *Annales des Sciences Naturalles, Botanique et Biologie Végétale* 18, 185-192.
- MONTANT, Ch. & THOMAS, L. (1978). Propriétés Physico-Chimiques du  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 3)  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 6) glucane exocellulaire produit par le Botrytis cinerea (Pers.). *Annales des Sciences Naturelles, Botanique et Biologie Végétale* 19, 40-43.
- NABEL, K. (1939). Uber die Membran Niedere Pilze, besonders von Rhizidiomyces bivellatus nov. spez. *Archives für Mikrobiologie* 10, 515-541.
- NELSON, N. (1944). A photometric adaptation of the Somogyi method to the determination of Glucose. *Journal of Biological Chemistry* 153, 375-380.
- NICOLAUS, R.A., PIATELLI, M. & FATTORUSO, E. (1964). The structure of melanins and melanogenesis. IV. On some natural melanins. *Tetrahedron* 20, 1163-1172.
- NORTHCOTE, D.H. (1972). Chemistry of the plant cell wall: *Annual Review of Plant Physiology* 23, 113-132.

- NOVAES-LEDIEU, M. & GARCIA-MENDOZA, C. (1970). Biochemical studies on walls synthesized by Candida utilis protoplasts. *Journal of General Microbiology* 61, 335-342.
- NOVAES-LEDIEU, M. & JIMENEZ-MARTINEZ, A. (1968). The structure of cell walls of Phycomycetes. *Journal of General Microbiology* 54, 407-415.
- NOVAES-LEDIEU, M., JIMENEZ-MARTINEZ, A. & VILLANUEVA, J.R. (1967). Chemical composition of hyphal walls of Phycomycetes. *Journal of General Microbiology* 47, 237-245.
- PEIRIS, J.W.L. (1947). The Botrytis disease of gladiolus, together with a physiological study of certain Botrytis species. Thesis for the degree of Ph. D. in the University of London.
- PERLIN, A.S. & TABER, W.A. (1963). A glucan produced by Claviceps purpurea. *Canadian Journal of Chemistry* 41, 2278-2282.
- POLACH, F.J. & ABAWI, G.S. (1975). The occurrence and biology of Botryotinia fuckeliana on beans in New York. *Phytopathology* 65, 657-660.
- RAISTRICK, H., & RINTOUL, M.L. (1931). Studies in the Biochemistry of Micro-organism. Part. XIII. On a new type of mucilaginous material, luteic acid, produced from glucose by Penicillium luteum Zukal. *Transactions of the Royal Society. B* 220, 255-267.
- REYNOLDS, E.S. (1963). The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *Journal of Cell Biology* 17, 208-212.



- RONBLE, C.J.M. & MORGAN, W.T.J. (1955). The determination of glucosamine and galactosamine. *Biochemical Journal* 61, 586-589.
- ROSENBERGER, R.F. (1975). The cell wall. En: *The Filamentous Fungi. II. Biosynthesis and Metabolism*. Editado por Smith, J.E. and Berry D.R. pp. 328-344.
- SALTON, M.R.J. (1961). *Microbial cell walls*. New York: Wiley.
- SANDFORD, P.A. & LASKIN, A. (1977). *Extracellular microbial polysaccharides*. Washington: American Chemical Society.
- SANTAMARIA, F., REYES, F., & LA HOZ, R. (1978). Extracellular glucan containing (1  $\rightarrow$  3)- $\beta$  and (1  $\rightarrow$  6)- $\beta$  linkages isolated from *Monilinia fructigena*. *Journal of General Microbiology* 109, 287-293.
- SENTANDREU, R. & NORTHCOTE, D.H. (1968). The structure of a glycopeptide isolated from the yeast cell wall. *Biochemical Journal* 109, 419-432.
- SIETSMA, J.H. & WESSELS, J.G.H. (1977). Chemical analysis of the hyphal wall of *Schizophyllum commune*. *Biochimica et Biophysica Acta* 496, 225-239.
- SIETSMA, J.H. & WESSELS, J.G.H. (1979). Evidence for covalent linkages between chitin and  $\beta$ -glucan in a fungal wall. *Journal of General Microbiology* 114, 99-108.
- SMITH, J.E. & BERRY, D.R. (1976). *An introduction to biochemistry of fungal development*. Academic Press INC (London).

- SOMOGYI, M. (1952). Notes on sugar determination. *Journal of Biological Chemistry* 195, 19-23.
- SUSSMAN, A.S. (1968). Longevity and survivability of fungi. En: *The Fungi*. III, 447-486, Editado por Ainsworth C.G. and Sussman, A.S. Academic Press, New York and London.
- TOWNSED, B.B. (1952). The morphology and physiology of the sclerotia and rhizomorphs of certain fungi. Thesis for the degree of Ph. D. in the University of Bristol.
- TOWNSEND, B.B. & WILLETTS, H.S. (1954). The development of sclerotia of certain fungi. *Transactions of the British Mycological Society* 37, 213-221.
- TREVETHICK, J. & COOKE, R.C. (1971). Effects of some metabolic inhibitors and sulphur-containing amino acids on sclerotium formation in Sclerotium rolfsii, S. delphinii and Sclerotinia sclerotiorum. *Transactions of the British Mycological Society* 57, 340-342.
- VAN WISSELINGH, C. (1898). Mikrochemische untersuchungen uber die Zellwande der fungi. *Jahrbuch für Wissenschaftliche Botanik Berlin* 31, 619-687.
- VILLANUEVA, J.R. (1966). Protoplasts of fungi. En: *The Fungi* II, 2-62. Editado por Ainsworth, G.C. and Sussman, A.S. Academic Press, New York and London.
- WALKER, J.C. (1952). *Diseases of vegetable crops*. McGraw-Hill, New York, pp. 529.
- WANG, S.Y. & Le TOURNEAU, D. (1971). Carbon sources, growth, sclerotium formation and carbohydrate composition of Sclerotinia sclerotiorum. *Archiv für Mikrobiologie* 80, 219-233.

- WANG, S.Y. & Le TOURNEAU, D. (1972). Amino acids as nitrogen sources for growth and sclerotium formation in Sclerotinia sclerotiorum. Transactions of the British Mycological Society 59, 509-512.
- WESSELS, J.G.H. (1965). Morphogenesis and biochemical processes in Schizophyllum commune. Wentia 13, 1-113.
- WESSELS, J.G.H., KREGER, D.R., MARCHANT, R., REGENSBURG, B.A., & De VRIES, O.M.H. (1972). Chemical and morphological characterization of the hyphal wall surface of the basidiomycete Schizophyllum commune. Biochimica et Biophysica Acta 273, 346-358.
- WETTSTEIN, F. (1921). Das vorkommen von chitin und seine verwertung als systematisch-phylogenetisches merkmale in pflanzenreich. Sitzungsberichte der Kaiserlichen Akademie der Wissenschaften in Wien Math. Naturwiss. Kl. Abt. 1. 30, 3-20.
- WHETZEL, H.H. (1945). A synopsis of the general of the species of the sclerotiniaceae, a family of stomatic inoperculate discomycetes. Mycologia 37, 648-714.
- WILLETTS, H.J. (1971). The survival of fungal sclerotia under adverse environmental conditions. Biological Reviews 46, 387-407.
- WILLETTS, H.J. (1972). The morphogenesis and possible evolutionary origins of fungal sclerotia. Biological Reviews 47, 515-536.
- WONG, A.L. & WILLETTS, H.J. (1974). Polyacrylamide-gel electrophoresis of enzymes during morphogenesis of sclerotia of Sclerotinia sclerotiorum. Journal of General Microbiology 81, 101-109.

- ZAUMEYER, W.J. & THOMAS, H.R. (1957). A monographic study of bean diseases and methods for their control. U.S. Department of Agriculture, Technical Bulletin 868, 255.
- ZHADANOVA, N.N. & POKHODENKO, V.D. (1973). Possible participation of melanin pigment in protection of fungal cell from dehydration. Mikrobiologiya, 42, 848-853.
- ZONNEVELD, B.J.M. (1971). Biochemical analysis of the cell wall of Aspergillus nidulans. Biochimica et Biophysica Acta, 249, 506-514.
- ZONNEVELD, B.J.M. (1972a). A new type of enzyme, and exo-splitting  $\alpha$ -1,3 glucanase from non-induced cultures of Aspergillus nidulans. Biochimica et Biophysica Acta, 258, 541-547.
- ZONNEVELD, B.J.M. (1972b). Morphogenesis in Aspergillus nidulans. The significance of  $\alpha$ -1,3 glucan of the cell wall and  $\alpha$ -1,3-glucanase for cleistothecium development. Biochimica et Biophysica Acta 273, 174-187.
- ZONNEVELD, B.J.M. (1973). Inhibitory effect of 2-deoxyglucose on cell wall,  $\alpha$  (1  $\rightarrow$  3) glucan synthesis and cleistothecium development in Aspergillus nidulans. Developmental Biology 34, 1-8.
- ZONNEVELD, B.J.M. (1974).  $\alpha$ -1,3 glucan synthesis correlated with  $\alpha$ -1,3 glucanase synthesis, conidiation and fructification in morphogenetic mutants of A. nidulans. Journal General Microbiology 81, 445-451.

